

10/516558

PCT/JP 03/00882

PCT/PTO 30 NOV 2004

30.01.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 6月 3日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-161400

[ST.10/C]:

[JP2002-161400]

出 願 人

Applicant(s):

茶野 徳宏
岡部 英俊
池川 志郎

REC'D 28 MAR 2003

WIPO

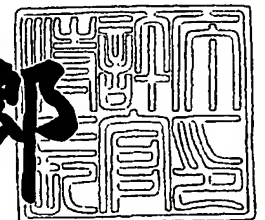
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3015538

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 SUMS001

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 21/00

【発明者】

 【住所又は居所】 〒525-0027 草津市野村5丁目9-34-80
 9

 【氏名】 茶野 徳宏

【特許出願人】

 【住所又は居所】 〒525-0027 草津市野村5丁目9-34-80
 9

 【氏名又は名称】 茶野 徳宏

【特許出願人】

 【住所又は居所】 〒612-8017 京都市伏見区桃山南大島町101
 -5

 【氏名又は名称】 岡部 英俊

 【電話番号】 075-612-1666

【特許出願人】

 【住所又は居所】 〒141-0021 東京都品川区上大崎1-12-2
 2-201

 【氏名又は名称】 池川 志郎

 【電話番号】 03-3280-3582

【代理人】

 【識別番号】 100088904

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 庄司 隆

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】RB1遺伝子誘導蛋白質 (RB1CC1) 及び遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト又は動物の細胞の核に存在し、転写因子機能及び／又はレチノブラストーマ遺伝子 (RB1遺伝子) 或いはその遺伝子産物の発現を誘導しうる機能を有する蛋白質又はポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載のヒト蛋白質が下記の群より選ばれるポリペプチド又は蛋白質； (1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又は蛋白質、 (2) 前記のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列の少なくとも5個のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、 (3) 前記のポリペプチド又は蛋白質と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド又は蛋白質、 (4) および前記 (1) から (3) のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加などの変異あるいは誘発変異を有するポリペプチド又は蛋白質。

【請求項3】 請求項1記載の動物蛋白質がマウス由来の蛋白質であり、下記の群より選ばれるポリペプチド又は蛋白質； (1) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又は蛋白質、 (2) 前記のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列の少なくとも5個のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、 (3) 前記のポリペプチド又は蛋白質と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド又は蛋白質、 (4) および前記 (1) から (3) のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加などの変異あるいは誘発変異を有するポリペプチド又は蛋白質。

【請求項4】 請求項1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする核酸またはその相補鎖。

【請求項5】 請求項3に記載の核酸またはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする核酸。

【請求項6】 配列表の配列番号3～4に記載の核酸またはその相補鎖の塩基配列のうち少なくとも15個の連続した塩基配列で示される核酸であって、該核酸の転写によって発現されるポリペプチドが請求項1～3記載のポリペプチドであ

る核酸。

【請求項 7】 請求項 4 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸を含有する組換えベクター。

【請求項 8】 請求項 7 の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 9】 請求項 8 の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質の製造方法。

【請求項 1 0】 請求項 4 ～ 6 に記載の核酸またはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする配列表の配列番号 5 ～ 1 3 2 に記載の核酸プライマー。

【請求項 1 1】 請求項 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質を免疫学的に認識する抗体。

【請求項 1 2】 請求項 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質の転写因子活性及び／又はRB1遺伝子の発現を誘導しうる機能を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法であって、請求項 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質、請求項 1 1 に記載の抗体のうち、少なくともいずれか 1 つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 1 3】 請求項 4 もしくは 6 に記載の核酸と相互作用して該核酸の発現を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法であって、請求項 4 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸、請求項 7 に記載のベクター、請求項 8 に記載の形質転換体、請求項 1 0 に記載の核酸プライマーのうち少なくともいずれか 1 つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 1 4】 請求項 1 2 又は 1 3 に記載のスクリーニング方法でスクリーニングされる化合物。

【請求項 1 5】 請求項 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質の転写因子活性及び／又はRB1遺伝子の発現を誘導しうる機能を阻害もしくは増強する化合物。

【請求項 1 6】 請求項 4 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸と相互作用して該核酸の発現を阻害もしくは増強する化合物。

【請求項 1 7】 請求項 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質、請求項 4 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸、請求項 7 に記載のベクター、請求項 8 に記載の形

質転換体、請求項10に記載の核酸プライマー、請求項11に記載の抗体、または請求項14～16のいずれか1項に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする、抗がん剤の治療に抵抗性である多剤耐性の治療に用いる医薬組成物。

【請求項18】 請求項1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質の発現または活性に関連した疾病の検査診断方法であって、試料中の（a）該ポリペプチド又は蛋白質をコードしている核酸、および／または（b）該ポリペプチド又は蛋白質をマーカーとして分析することを含む検査診断方法。

【請求項19】 癌細胞の検査方法又は癌の診断方法である請求項18の検査診断方法。

【請求項20】 請求項11に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質の全部又は一部の発現、増加、減少、欠損等を検査する請求項18又は19に記載の方法。

【請求項21】 請求項10に記載の核酸プライマーの少なくとも何れかの1つを用いて請求項1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする遺伝子を増幅させる工程を経て、請求項1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする遺伝子の全部又は一部の発現、変異、欠損又は挿入等を検査する請求項18又は19に記載の方法。

【請求項22】 癌抑制遺伝子レチノブラストーマ遺伝子（RB1遺伝子）或いはその遺伝子産物（RB1蛋白質）の全部又は一部の発現、増加、減少、変異、欠損又は挿入等を検査することを組み合わせることを特徴とする請求項18～21に記載の方法。

【請求項23】 多剤耐性遺伝子、（MDR1遺伝子）の或いはその遺伝子産物（MDR1蛋白質：P-糖蛋白質）の全部又は一部の発現、増加、減少、変異、欠損又は挿入等を検査することを組み合わせることを特徴とする請求項18～22に記載の方法。

【請求項24】 請求項23記載の方法を用いる癌細胞の薬剤感受性を検査する方法。

【請求項25】 請求項18～24に記載の方法に用いる検査診断試薬およびキッ

ト。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、癌抑制遺伝子（レチノブラストーマ遺伝子：RB1遺伝子）の発現を誘導しうる新規な蛋白質およびポリペプチド（以下新規蛋白質RB1CC1）に関するものである。さらに詳しくは、新規蛋白質のアミノ酸配列の全部または一部を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸（以下RB1CC1遺伝子）、該核酸を含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該形質転換体を使ったペプチドまたはポリペプチドの製造方法、該ペプチドまたはポリペプチドに対する抗体、これらを利用した化合物のスクリーニング方法、該スクリーニングされた化合物、該ポリペプチド若しくは該核酸に作用する活性阻害化合物または活性賦活化合物、これらに関する医薬組成物、及びこれらに関する疾病の検査診断方法並びに試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

【0003】

抗がん剤の治療に抵抗性である多剤耐性（MDR）は癌治療を困難にさせている。MDRの成因は明確ではないが、いくつかの癌ではMDR関連遺伝子（MDR1遺伝子）産物であるP-糖蛋白質が関与していると言われている。一方、他の癌ではP-糖蛋白質の発現が癌の発生や転移と逆に相関することも知られている。これらのP-糖蛋白質の異なる効果は異なる遺伝子産物の抑制を受けているか或いは異なった相互作用をしていると考えられる。MDRに関連する遺伝子の検索はこれらの現象を解明する上で必須である。

【0004】

【解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、上記のように抗がん剤に対する多剤耐性に関与する遺伝子およびその遺伝子産物を見いだすことである。より具体的には、本発明の課題は癌抑制遺伝子（レチノブラストーマ遺伝子：RB1遺伝子）の発現を誘導しうる新規な蛋白質およびポリペプチド（新規蛋白質RB1CC1）を提供することである。また本発明の別の課題は、新規蛋白質のア

ミノ酸配列の全部または一部をコードする核酸（以下RB1CC1遺伝子）を提供し、遺伝子工学手法による、蛋白質又はポリペプチド（新規蛋白質RB1CC1）の製造法を提供することである。さらに本発明の別の課題は、新規蛋白質RB1CC1由来のポリペプチドに対する抗体を提供することである。その他の本発明の課題は、上記のものを利用して新規蛋白質RB1CC1の有する作用の阻害剤・拮抗剤・賦活剤のスクリーニングをおこなうことであり、スクリーニングされた化合物を提供することであり、またこれらを利用した抗がん剤の治療に抵抗性である多剤耐性（MDR）の治療に用いる医薬組成物を提供することである。また別の本発明が解決しようとする課題は、本発明中で明らかになった、癌抑制遺伝子（レチノブラストーマ遺伝子：RB1遺伝子）の発現を誘導しうる新規の蛋白質およびポリペプチド（RB1CC1蛋白質）又は該蛋白質のアミノ酸配列の全部または一部をコードする核酸（以下RB1CC1遺伝子）、これを検査することによって癌細胞又は癌の診断方法を提供することである。さらに、該蛋白質のアミノ酸配列の全部または一部をコードする核酸を増幅しうる核酸プライマーを提供し、該プライマーを用いた核酸の増幅産物を検査することによる癌細胞又は癌の診断方法を提供することである。そして、該蛋白質又はポリペプチド（RB1CC1蛋白質）と反応しうる抗体を提供することであり、またその抗体を用いた免疫学的な検査方法を提供する。又本発明の課題は該検査方法に用いられる該プライマー又は該抗体を用いた検査試薬又はキットを提供することでもある。

【0005】

【解決する手段】課題解決のため、本発明者らは、U-2 OS骨肉腫細胞とMDR変異誘導細胞の間で別々に発現されている遺伝子を検索しその塩基配列および該新規蛋白質のcDNAがコードするアミノ酸配列を決定した。また動物においても同様な蛋白質が存在することを証明するためマウスの新規蛋白質のアミノ酸配列および該新規蛋白質のcDNAがコードするアミノ酸配列を決定した。さらには、これらの蛋白質を認識する抗体を調製し、遺伝子の発現、変異、欠損等の検査に加えて免疫学的な検討を行い、ある種の癌細胞において本遺伝子の発現及び蛋白質の発現が抑制されていることを見出し、本発明を完成した。

【0006】

すなわち、本発明は以下の構成よりなる。

1、ヒト又は動物の細胞の核に存在し、転写因子機能及び／又はレチノブラストーマ遺伝子（RB1遺伝子）或いはその遺伝子産物の発現を誘導しうる機能を有する蛋白質又はポリペプチド。

2、上記1記載のヒト蛋白質が下記の群より選ばれるポリペプチド又は蛋白質；

（1）配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又は蛋白質、（2）前記のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列の少なくとも5個のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、（3）前記のポリペプチド又は蛋白質と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド又は蛋白質、（4）および前記（1）から（3）のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加などの変異あるいは誘発変異を有するポリペプチド又は蛋白質。

3、上記1記載の動物蛋白質がマウス由来の蛋白質であり、下記の群より選ばれるポリペプチド又は蛋白質；（1）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又は蛋白質、（2）前記のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列の少なくとも5個のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、（3）前記のポリペプチド又は蛋白質と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド又は蛋白質、（4）および前記（1）から（3）のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加などの変異あるいは誘発変異を有するポリペプチド又は蛋白質。

4、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする核酸またはその相補鎖。

5、上記3に記載の核酸またはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする核酸。

6、配列表の配列番号3～4に記載の核酸またはその相補鎖の塩基配列のうち少なくとも15個の連続した塩基配列で示される核酸であって、該核酸の転写によって発現されるポリペプチドが上記1～3記載のポリペプチドである核酸。

7、上記4～6のいずれか1項に記載の核酸を含有する組換えベクター。

8、上記7の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

9、上記8の形質転換体を培養する工程を含む、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質の製造方法。

10、上記4～6に記載の核酸またはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする配列表の配列番号5～132に記載の核酸プライマー。

11、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質を免疫学的に認識する抗体。

12、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質の転写因子活性及び／又はRB1遺伝子の発現を誘導しうる機能を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法であって、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質、上記11に記載の抗体のうち、少なくともいずれか1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

13、上記4もしくは6に記載の核酸と相互作用して該核酸の発現を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法であって、上記4～6のいずれか1項に記載の核酸、上記7に記載のベクター、上記8に記載の形質転換体、上記10に記載の核酸プライマーのうち少なくともいずれか1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

14、上記12又は13に記載のスクリーニング方法でスクリーニングされる化合物。

15、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質の転写因子活性及び／又はRB1遺伝子の発現を誘導しうる機能を阻害もしくは増強する化合物。

16、上記4～6のいずれか1項に記載の核酸と相互作用して該核酸の発現を阻害もしくは増強する化合物。

17、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質、上記4～6のいずれか1項に記載の核酸、上記7に記載のベクター、上記8に記載の形質転換体、上記10に記載の核酸プライマー、上記11に記載の抗体、または上記14～16のいずれか1項に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする、抗がん剤の治療に抵抗性である多剤耐性の治療に用いる医薬組成物。

18、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質の発現または活性に関連した疾病の検査診断方法であって、試料中の（a）該ポリペプチド又は蛋白質をコードしている核酸、および／または（b）該ポリペプチド又は蛋白質をマーカーと

して分析することを含む検査診断方法。

19、癌細胞の検査方法又は癌の診断方法である上記18の検査診断方法。

20、上記11に記載の抗体を用いることを特徴とする、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質の全部又は一部の発現、増加、減少、欠損等を検査する上記18又は19に記載の方法。

21、上記10に記載の核酸プライマーの少なくとも何れかの1つを用いて上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする遺伝子を増幅させる工程を経て、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする遺伝子の全部又は一部の発現、変異、欠損又は挿入等を検査する上記18又は19に記載の方法。

22、癌抑制遺伝子レチノブラストーマ遺伝子(RB1遺伝子)或いはその遺伝子産物(RB1蛋白質)の全部又は一部の発現、増加、減少、変異、欠損又は挿入等を検査することを組み合わせることを特徴とする上記18～21に記載の方法。

23、多剤耐性遺伝子、(MDR1遺伝子)の或いはその遺伝子産物(MDR1蛋白質:P-糖蛋白質)の全部又は一部の発現、増加、減少、変異、欠損又は挿入等を検査することを組み合わせることを特徴とする上記18～22に記載の方法。

24、上記23記載の方法を用いる癌細胞の薬剤感受性を検査する方法。

25、上記18～24に記載の方法に用いる検査診断試薬およびキット。

【0007】

【発明の実施の形態】(新規蛋白質RB1CC1)本発明において提供される新規蛋白質RB1CC1をコードする核酸は、U-2 OS骨肉腫細胞とMDR変異誘導細胞の間に別々に発現されている遺伝子を検索し、配列表・配列番号5～37に記載の核酸プライマーを用いて、U-2 OS mRNAを鋳型として増幅し、その塩基配列および該新規蛋白質のcDNAがコードするアミノ酸配列を決定し、新規なアミノ酸配列を有する物質として、そのcDNAが取得されたものである。本発明の新規蛋白質RB1CC1のcDNAは、6.6-kbの長さを持ち、4782ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム(ORF)を含み、分子量180kDaの1594個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしていた。

【0008】

ヒト新規蛋白質RB1CC1はコンセンサス核局在シグナル配列部位（リジン-プロリン-アルギニン-リジン配列：K P R K）、ロイシンジッパーモチーフ配列部位及びコイル-コイル構造を有していた。ヒト新規蛋白質RB1CC1はDNA結合転写機能を持つことが示唆された。

【 0 0 0 9 】

（マウス新規蛋白質Rb1cc1）マウス筋肉のmRNAを鋳型にして配列表の配列番号53～83に記載の核酸プライマーを用いて増幅・解析した。得られたマウス新規蛋白質Rb1cc1をコードするcDNAは6518bpの鎖長であり、1588アミノ酸をコードしている4764bpのオープンリーディングフレーム（ORF）を持っていた。マウス新規蛋白質Rb1cc1の遺伝子はヒト新規蛋白質RB1CC1遺伝子と89%の相同性を持っていた。マウス新規蛋白質Rb1cc1もヒトと同様コンセンサス核局在シグナル配列部位（リジン-プロリン-アルギニン-リジン配列：K P R K）、ロイシンジッパーモチーフ配列部位及びコイル-コイル構造を有していた。マウス新規蛋白質Rb1cc1もDNA結合転写機能を持つことが示唆された。

【 0 0 1 0 】

（新規蛋白質及び遺伝子の機能）MDRにおける本発明のRB1CC1遺伝子の役割を調べるために、親細胞U-2 OS細胞、MDRに変異した細胞（U-2 OS/DX580）とMDR1遺伝子を導入したU-2 OS細胞（U-2/D0X035）に対してドキソルビシン（doxorubicin）処理をした場合のRB1CC1遺伝子の発現を比較したところ、親細胞U-2 OS細胞と遺伝子導入コントロール細胞（U-2/Neo8）において、ドキソルビシン（doxorubicin）はRB1CC1遺伝子の発現を低下させ、細胞死を誘導した。対照的に、MDRに変異した細胞においてはドキソルビシン（doxorubicin）処理はRB1CC1遺伝子の発現レベル、細胞生存期間又は細胞増殖に抑制効果を示さず、MDR1遺伝子を有する細胞ではRB1CC1遺伝子の発現を増加させた。これらの細胞ではRB1CC1遺伝子の発現とRB1遺伝子の発現が相関し、両遺伝子の発現はこれらの細胞の増殖を持続させた。

【 0 0 1 1 】

本発明のRB1CC1遺伝子とRB1遺伝子の発現の関係を調べるために、U-2 OSヒト骨肉種細胞の5種のMDRへの変異株と24種のヒト腫瘍細胞（10種の骨肉種、

4種の肺癌、7種の乳癌、3種の血液癌)での両遺伝子の発現を調べたところ、全ての細胞でRB1CC1遺伝子の発現はRB1遺伝子の発現と強く相関した。非腫瘍組織のノーザンブロット解析においてもRB1CC1遺伝子とRB1遺伝子の発現は同様な相関を示した。

【0012】

さらに、K562細胞とジャーカット (J u r k a t) 細胞において本発明のRB1CC1遺伝子の外来性発現はRB1遺伝子発現を増加させた。MDR1遺伝子の発現はこれらの細胞では検出できなかった。RB1CC1遺伝子の誘導はRB1遺伝子のプロモーターの転写活性も刺激した。RB1CC1遺伝子の導入はRB1遺伝子のプロモーターの刺激活性を通じてRB1遺伝子の発現を上昇させた。

【0013】

新規蛋白質RB1CC1のアミノ酸配列、その核局在性及びその発現パターンから、本発明のRB1CC1遺伝子は分子中間体を通して直接或いは間接的に、R B 1 遺伝子発現を増強させる転写因子である可能性がある。ヒト及びマウス由来R B 1 遺伝子のプロモーター配列の解析からSp1やATFのような構成転写因子が存在する可能性は示されているが、RB1遺伝子発現を直接制御する転写因子は知られていない。約80%のヒトの癌においてはRB1遺伝子経路に存在する分子がその発癌機構に関連しており、RB1遺伝子の制御不能が多くの人の癌に重要な役割をしている。

【0014】

本発明のヒト及びマウスのRB1CC1遺伝子は表1に示すようにヒトでは74kb、マウスでは57kb以上の長さを有している24のエキソンと23個のイントロンから構成されている。そしてエキソン3の部位に翻訳開始箇所がある。マウスにおけるこの遺伝子構造は、配列表・配列番号84?132に記載のプライマーを用いて明らかにした。この遺伝子の染色体上の局在部位を調べたところ、ヒトでは第8染色体上の8q11.2に、マウスでは第1染色体の1A2-4に存在していることがわかった。

【表 1】

表 1 RB1CC1 遺伝子の構造

エキソン			イントロン			配列	
番号	位置 (bp)		番号	位置 (bp)		ヒト	マウス
ヒト	マウス		ヒト	マウス		スプライシング受容体配列	スプライシング受容体配列
1	358	296	1	9.1	11.2	GGGTTGCGG	gtaagtgtcg
2	115	110	2	1.3	1.8	GGGCTGACG	gtaagtgtcg
3	122	115	3	1.4	3.5	CAGTGGGAC	gttggtgtga
4	127	127	4	0.2	0.1	TGCTGGGAC	gttggtgtga
5	171	171	5	7.0	3.8	GGTGGATTC	gttggtgtga
6	203	203	6	2.1	1.3	AACTACTCA	gttggtgtga
7	430	427	7	5.7	3.8	CTGACGACG	gtaagtgtcg
8	171	171	8	6.3	0.3	GGTGGATTC	gttggtgtga
9	183	183	9	0.3	0.2	CTGACGACG	gtaagtgtcg
10	187	187	10	0.1	0.1	CTGACGACG	gtaagtgtcg
11	82	82	11	0.3	0.1	AAATATTTA	gtaagtgtcg
12	62	62	12	1.5	1.6	CTGACGACG	gtaagtgtcg
13	104	104	13	0.8	0.3	CTGACGACG	gtaagtgtcg
14	127	127	14	0.1	0.1	CTGACGACG	gtaagtgtcg
15	1901	1892	15	10.1	10.0	CTGACGACG	gtaagtgtcg
16	166	166	16	2.9	1.6	CTGACGACG	gtaagtgtcg
17	109	109	17	0.1	0.1	CTGACGACG	gtaagtgtcg
18	241	241	18	6.3	1.1	CTGACGACG	gtaagtgtcg
19	55	49	19	1.0	1.0	CTGACGACG	gtaagtgtcg
20	48	48	20	4.4	3.0	CTGACGACG	gtaagtgtcg
21	59	59	21	2.3	2.1	CTGACGACG	gtaagtgtcg
22	137	137	22	3.5	2.0	CTGACGACG	gtaagtgtcg
23	71	71	23	0.8	1.6	CTGACGACG	gtaagtgtcg
24	1401	1379				CTGACGACG	gtaagtgtcg

エキソン配列は大文字で、イントロン配列は小文字で示した。

【0015】

本発明のRB1CC1遺伝子の変異を検出するために、35例の原発性乳癌から調製したcDNAを用いてRB1CC1遺伝子を解析したところ、7例の癌で9種類の変異を確認した。9種類全ての変異はエキソン3-24での抜け落ちの存在であり、断片化した新規蛋白質RB1CC1はコンセンサス核局在シグナル配列部位、ロイシンジッパーモチーフ配列部位及びコイル-コイル構造が失われており、基本的な新規蛋白質RB1CC1の機能がないものであった。

【0016】

2例の原発乳癌（MMK 3と6）では両方の対立遺伝子において複数のヘテロ接合体の抜け落ちがあり、抜け落ちを持つRB1CC1遺伝子からは明らかに断片化された新規蛋白質RB1CC1が得られることが予測される。MMK 6ではエキソン3-24（ヌクレオチド、534-5322）とエキソン9-23（ヌクレオチド、1757-5187）での抜け落ちがあり、コドン4と411でそれぞれフレームシフトをしていた。MMK 3においては、エキソン3-24（ヌクレオチド、535-5324）とエキソン5-11（ヌクレオチド、849-2109）での抜け落ちがあり、前者ではコドン4での終止が起こり、後者ではコドン

109でのフレームシフトを引き起こし122アミノ酸の断片蛋白が得られる結果になっていた。癌試料のゲノムDNAのPCRではそれぞれの抜け落ち変異に対応する変則な生成物が検出されたのに対して、胚細胞DNAでは変異が認められないことから、これらの変異は体細胞で見出されるものである。これらの癌では新規蛋白質RB1CC1が検出されず、そしてRB1蛋白質がMMK6では欠如しており、MMK3では優位に減少していた。両方とも染色体のRB1ローカスでのヘテロ接合性の消失はなかった。一方、RB1CC1遺伝子の変異がない癌試料（MMK12と29）では新規蛋白質RB1CC1とRB1蛋白質の両方が存在していた。このことはRB1CC1遺伝子の不活性化変異はRB1遺伝子の発現を不十分にし、RB1遺伝子経路の制御不能を促進し、そして癌発生を引き起こすことが示唆される。

【0017】

5例の他の乳癌（MMK1、15、31、38及び40）においても、機能を持たない断片蛋白質を生成するRB1CC1遺伝子内での抜け落ちを検出した。これらの変異は全てヘテロ接合体であったが、RB1CC1ローカスでのヘテロ接合性の消失も存在しており、すべてのケースでRB1CC1遺伝子の発現もないことより、両方の対立遺伝子で機能消失が起きていることが示唆された。これらの癌においてRB1蛋白質の発現がRB1CC1遺伝子とRB1遺伝子の変異がないケース（MMK12と29）に比較して明らかに減少していた。これらの5例（MMK1、15、31、38及び40）ではRB1ローカスでのヘテロ接合性の消失は認められなかった。

【0018】

本発明のRB1CC1遺伝子のホモ接合不活性化は乳癌の発生に関連している。調べた原発乳癌の約20%において、明らかに機能を持たない断片の新規蛋白質RB1CC1を生成するRB1CC1遺伝子の抜け落ち変異が認められた。これらの癌の2例はRB1CC1遺伝子内部での複数のヘテロ接合の抜け落ちであり、残りはRB1CC1遺伝子のヘテロ接合性の消失であった。7例全てで新規蛋白質RB1CC1は検出できないが、RB1CC1遺伝子の変異のない癌では蛋白質が発現されていた。RB1蛋白質はRB1ローカスでのヘテロ接合の消失がないにも拘わらず、7例全てで存在しないか又は有意に減少していた。

新規蛋白質RB1CC1はRB1遺伝子の発現を増加させる方向に制御しており、乳癌に

においてRB1CC1遺伝子は腫瘍抑制因子として働いている。そして、RB1CC1遺伝子の異常・不活化は、RB1遺伝子の発現低下をもたらし、癌の発生・進行を引き起こす。

【0019】

上述のようにRB1CC1遺伝子および蛋白質の発現がRB1遺伝子の発現と相関していることから、本発明のRB1CC1遺伝子および蛋白質検査をRB1遺伝子の発現又は蛋白質の発現と組み合わせて検査することによってより有用な癌細胞又は癌の診断方法が提供される。

【0020】

さらに多剤耐性遺伝子（MDR1）又は蛋白質と組み合わせる検査によって、薬剤の癌又は癌細胞に対する効果を調べることができ、抗癌剤の選択、効果の予測に有用な検査方法又は診断方法が提供される。

【0021】

（ポリペプチド又は蛋白質）本発明の新規蛋白質は、配列表の配列番号1又は2に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド又は蛋白質である。さらに本発明のポリペプチド又は蛋白質は、この配列表の配列番号1又は2に示すポリペプチドの部分配列を有するポリペプチドから選択される。その選択されるポリペプチドは、配列表の配列番号1又は2に示すポリペプチドと、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%をこえる相同性を有する。この相同性をもつポリペプチドの選択は、例えばRB1遺伝子又はRB1蛋白質の発現を指標にして行うことができる。

【0022】

アミノ酸配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法、推定される核酸の塩基配列を決定後これにコードされるアミノ酸配列を推定する方法等を使用することができる。

【0023】

本発明のポリペプチドは、配列表の配列番号1又は2に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド又は蛋白質の部分配列を有するポリペプチドから選択されるアミノ酸配列を試薬・標準物質・免疫原として利用できる。その最小単位としては

、少なくとも約5個以上、好ましくは少なくとも約8～10個以上、さらに好ましくは少なくとも約11～15個以上のアミノ酸で構成されるアミノ酸配列からなり、免疫学的にスクリーニングしうるポリペプチドを本発明の対象とする。

【0024】

さらに、このように特定されたポリペプチドをもとにして、RB1遺伝子又はRB1蛋白質の発現を指標とすることにより、1ないし数個のアミノ酸の欠失・置換・付加などの変異あるいは誘発変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドも提供することができる。欠失・置換・付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、例えばUlmerの技術(Science, 219:666, 1983)を利用することが出来る。さらに、これら利用できるペプチドは、その構成アミノ基もしくはカルボキシル基などを修飾するなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

【0025】

本発明のポリペプチドは、それら自体で、新規蛋白質RB1CC1の機能を制御するための医薬組成物に使用できる。また、本発明のポリペプチド又は蛋白質は、新規蛋白質RB1CC1の機能を制御しうる化合物、例えば、阻害剤、拮抗剤、賦活剤等を得るためのスクリーニングや、新規蛋白質RB1CC1に対する抗体の取得に用いることができる。さらに、本発明のポリペプチド又は蛋白質は、試薬・標準品としても使用可能である。

【0026】

(核酸) 本発明の核酸およびその相補鎖は、配列表の配列番号1又は2に記載のアミノ酸配列をコードする、配列表の配列番号3又は4に記載の核酸および該核酸に対する相補鎖、これらの核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする核酸、およびこれらの核酸のうち少なくとも15個の連続した塩基配列を有しかつコードするペプチドが新規蛋白質RB1CC1に対する抗体と結合能を有する核酸を意味する。核酸としてDNAを代表例にとると、「DNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、自体公知の方法で例えばMolecular Cloning: A laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 本の名前ですよ？出版社、出版年度がいてるのでは？)に記載の

方法によって得ることができる。ここで、「ストリンジェントな条件下でハイブリタイズする」とは、例えば、 $6 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ および 50% ホルムアミドの溶液中で 42°C にて加温した後、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ の溶液中で 68°C にて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリタイズのシグナルが観察されることを表す。

【0027】

本発明の核酸は、配列表の配列番号1又は2に記載のアミノ酸配列をコードする、配列表の配列番号3又は4の核酸の情報から選択される相同鎖および相補鎖を意味し、指定されたヌクレオチド配列の領域に対応する少なくとも約 $15 \sim 20$ 個以上の配列からなる核酸配列及び該相補鎖を意味する。この有用な核酸配列の決定は、公知の蛋白質発現系、例えば無細胞蛋白質発現系を利用して簡易に発現蛋白質の確認を行い、その生理活性新規蛋白質RB1CC1に対する抗体との結合性を指標にして選別することにより行うことができる。無細胞蛋白質発現系としては、例えば胚芽、家兎網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用できる（Nature、179、160～161、1957）。

【0028】

これらの核酸は、いずれも本発明の新規蛋白質RB1CC1および本発明のポリペプチド又は蛋白質の製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、これらをコードする遺伝子等の核酸、またはmRNA検出のためのプローブもしくはプライマーとして、あるいは遺伝子発現を制御するためのアンチセンスオリゴマーとして使用することができる。さらに、本発明の核酸は、核酸に関する試薬・標準品としても利用できる。

【0029】

（形質転換体）上記のような無細胞蛋白質発現系以外にも、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術によって、本発明からなる新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチドを提供可能である。

【0030】

形質転換は、自体公知の手段を応用することができ、例えばレプリコンとして

、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換を行う。より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法があげられるが、簡便には核外遺伝子を用いた自律複製系を利用する。ベクターは、宿主の種類により選択され、発現目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列とを構成要素とする。構成要素は宿主が原核細胞か真核細胞かによって選択し、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等を自体公知の方法によって組合せて使用する。

【0031】

形質転換体は、自体公知の各々の宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養することにより、本発明のポリペプチドの製造に用いることができる。培養は、発現産生される新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチドの生理活性、特にRB1遺伝子誘導活性又はDNA結合性転写因子活性を指標にして行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチによって行う。

【0032】

(新規蛋白質RB1CC1およびその由来物の回収) 培地からの新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチドの回収は、新規蛋白質RB1CC1に対する抗体との結合性を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を組合せるか、溶解度差にもとづく硫酸、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。

【0033】

(抗体) 抗体は、本発明の新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチドの抗原決定基を選別し、作成する。抗原決定基は、少なくとも5個、より好ましくは少なくとも8～10個のアミノ酸で構成される。このアミノ酸配列は、必ずしも配列表の配列番号1又は2と相同である必要はなく、蛋白質の立体構造上の外部への露出部位であればよく、露出部位が不連続部位であれば、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であることも有効である。抗体は、免疫学的に新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチドを認識する限り特に

限定されない。この認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定する。

【0034】

抗体を産生するためには、本発明の新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチドを、アジュバントの存在または非存在下で、単独または担体に結合して、動物に対して体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導を行う。担体は、自身が宿主に対して有害作用をおこさなければ特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫する動物としては、マウス、ラット、兎、やぎ、馬等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の血清からの抗体回収法によって取得する。

【0035】

モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞を回収し、自体公知の永久増殖性細胞への形質転換手段を導入することによって行われる。

【0036】

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、直接本発明からなる新規蛋白質RB1CC1と結合し、その活性を制御可能であり、新規蛋白質RB1CC1とRB1遺伝子又は蛋白質の発現の制御を容易に行うことができる。そのため、RB1遺伝子産物と新規蛋白質RB1CC1が関連する疾患の治療・予防のために有用である。

【0037】

(スクリーニング) かくして調製された新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチド、これらをコードする核酸およびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、並びに新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数手段を組合せることによって、新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチドとの結合性、新規蛋白質RB1CC1の機能、または新規蛋白質RB1CC1の発現に対する阻害剤もしくは賦活剤のスクリーニングに有効な手段を提供する。すなわち、本発明のポリペプチド、本発明の抗体の少なくともいずれか1つを用いることで、本発明のポリペプチド又は蛋白質とRB1遺伝子又は蛋白質の発現を阻害もしくは増強する化合物を得るためのスクリーニング方法が、本発明

の核酸、本発明のベクター、本発明の形質転換体、本発明の抗体の少なくともいずれか1つを用いることで本発明の核酸と相互作用し該核酸の発現を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法が、本発明のポリペプチド又は蛋白質、本発明の抗体の少なくともいずれか1つを用いることで本発明のポリペプチド又は蛋白質のRB1遺伝子又は蛋白質の発現制御機能を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法が提供可能である。例えば、ポリペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質発現系を利用した遺伝子レベルでの発現調整剤の選別、抗体を利用した抗体認識物質の選別等が、自体公知の医薬品スクリーニングシステムにおいて利用可能である。

【0038】

(化合物、医薬組成物) 上記のスクリーニング方法で得られた化合物は、新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチドのRB1遺伝子又は蛋白質の発現制御機能を調節する阻害剤、拮抗剤、賦活剤等の候補化合物として利用可能である。また、遺伝子レベルでの新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチドの発現に対する阻害剤、拮抗剤、賦活剤等の候補化合物としても利用可能である。上記の阻害剤、拮抗剤、賦活剤等の候補化合物としては、蛋白質、ポリペプチド、抗原性を有さないポリペプチド、低分子化合物等が挙げられ、好ましくは低分子化合物である。

【0039】

かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、骨肉腫、白血病、更に、乳腺、前立腺、肺、及び大腸由来の腫瘍等の治療に用いる医薬組成物として調製可能である。また、本発明からなる新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチド、これらをコードする核酸およびその相補鎖、これらの塩基配列を含むベクター並びに、新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それら自体が、新規蛋白質RB1CC1とRB1遺伝子産物との相互作用に対する阻害・拮抗・賦活等の機能を有する、乳癌、前立腺癌等の治療に用いる医薬手段として使用できる。ここで、乳癌、前立腺癌等とは、良性腫瘍ならびに悪性腫瘍を含み、なお、製剤化にあたっては、自体公知のポリペプチド、蛋白質、核酸、抗体

等、各対象に応じた製剤化手段を導入すればよい。

【0040】

本発明からなる新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチド、これらをコードする核酸およびその相補鎖、これらの塩基配列を含むベクター並びに、新規蛋白質RB1CC1およびその由来物からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、本発明のポリペプチドの発現またはその活性が関連する疾患、例えば、本発明の新規蛋白質RB1CC1の発現またはRB1遺伝子又はその産物との相互作用に関連した疾患等の検査診断方法として使用することができる。特に、乳癌、前立腺癌等の診断マーカーおよび／または試薬等の検査診断方法として有用である。診断は、新規蛋白質RB1CC1をコードしている核酸配列との相互作用・反応性を利用して、相応する核酸配列の存在量を決定すること、および／または新規蛋白質RB1CC1について生体内分布を決定すること、および／または新規蛋白質RB1CC1の試料中での存在量を決定することによって行う。詳しくは、新規蛋白質RB1CC1を診断マーカーとして検定する。その測定法は、自体公知の抗原抗体反応系、酵素反応系、PCR反応系等を利用すればよい。さらに、検査診断の方法に用いる試薬キットなども含まれる。

【0041】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【0042】

【実施例1】（ヒトRB1CC1のcDNA）MDRに関連する遺伝子を同定するために、U-2 OS骨肉腫細胞とMDR変異誘導細胞の間で別々に発現されている遺伝子を検索し新規ヒト遺伝子を同定した。配列表の配列番号5と26のプライマー対（CC1-S1及びCC1-AS1）及び配列番号6と25のプライマー対（CC1-S2及びCC1-AS2）を用いてクローニングし、更に配列番号7～24のプライマーを使ってその核酸配列を決定した。また、市販のcDNA末端配列迅速増幅キット（RACEキット、ロッシュ社製）を用い、配列番号27～37のプライマーを使って、5'末端及び3'末端cDNAの配列を同定した。DNAとそのコードされるアミノ酸配列はDNAsis ver. 3.2 シークエンスアナラ

イザー（日立ソフトウェア製）とPSORT II (<http://www.yk.rim.or.jp/~aisoai/molbio-j.html>) を用いて解析した。その結果、そのcDNAは、6.6-kbの長さを持ち、4782ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム（ORF）を含み、180kDaの分子量で1594個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしていた。

【0043】

【実施例2】（マウスRb1cc1のcDNA）マウス筋肉のmRNAを鋳型にRT-PCR法を用いて増幅させ、配列表の配列番号53と73のプライマー対（MCC1-S1及びMCC1-AS1）及び配列番号54と72のプライマー対（MCC1-S2及びMCC1-AS2）を使ってクローニングした。そして更に配列表・配列番号55～71のプライマーを使ってその核酸配列を決定した。また、配列表の配列番号74～77のプライマー（MCC-ASR1、MCC-ASR2、MCC-ASR3及びINTRON1ASR）を5'末端RACE用プライマー、配列番号78～83のプライマー（MCC-SR1、MCC-SR2、MCC3-S3、MCC3-S4、MCC3-AS2及びMCC3-AS3）を3'末端RACE用プライマーとしてcDNAの迅速増幅を行った以外は実施例1と同様に操作してマウス新規蛋白質Rb1cc1のcDNAを同定した。マウス新規蛋白質Rb1cc1をコードするcDNAは6518bpの鎖長であり、1588アミノ酸をコードしている4764bpのオープンリーディングフレーム（ORF）を持っている。マウス新規蛋白質Rb1cc1の遺伝子はヒト新規蛋白質RB1CC1遺伝子と、核酸レベルにて86%、蛋白レベルにて89%の相同性を持っていた（配列番号1～4参照）。

【0044】

【実施例3】（本発明のRB1CC1遺伝子とMDR1遺伝子の分析）親細胞U-2 OS細胞と数種のMDR変異細胞におけるRB1CC1遺伝子とMDR1遺伝子の発現レベルをノーザンブロットで解析した。RB1CC1遺伝子の解析用プローブはRB1CC1遺伝子配列のヌクレオチド番号4190～4654の間にハイブリダイズするものを用い、MDR1遺伝子にはMDR1遺伝子のヌクレオチド番号834～1119にハイブリダイズするプローブを用いた。プローブはデオキシシトシン3リン酸の α 位のリンを放射性

同元素に置換した α - ^{32}P -dCTPでラベルして用いた。グリセロールデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を mRNA 発現の指標として用いた。その結果両遺伝子の発現レベルは逆相関した (図 1)。

【0045】

【実施例 4】 (抗体の調製とウエスタンブロット解析) 本発明の新規蛋白質 RB1CC1 のアミノ酸配列 642-658 (RB1CC-642)、744-757 (RB1CC-744) 及び 1104-1118 (RB1CC-1104) の 3 種類の合成ポリペプチドを調製し、それぞれのポリペプチドのアミノ末端にシステイン残基を導入したものを、ウサギに通常の方法で免疫し抗体を得た。U-2 OS 細胞の核成分と細胞質成分をそれぞれ SDS-PAGE 後、調製した抗体を用いてウエスタンブロットによる解析を行った。その結果、分子量 180 kDa の RB1CC1 蛋白質が核に存在していることが示された (図 2)。

マウス NIH3T3-3 細胞の核成分と細胞質成分を同様に電気泳動後、RB1CC-642 抗体を用いてウエスタンブロット解析した。同時に抗スタスミンウサギ抗体を用いてスタスミンの検出も行った。その結果、Rb1cc1 蛋白質は核に局在し、スタスミンは細胞質に存在していることが示された。さらに同細胞を各抗体による免疫細胞染色を行い比較したところ、RB1CC-642 抗体では核が染色され、一方抗スタスミンウサギ抗体では細胞質が染色された (図 3)。

以上の結果、本発明の新規蛋白質 RB1CC1 は哺乳動物細胞の核に存在することが示された。

【0046】

【実施例 5】 (本発明の RB1CC1 遺伝子の発現に対する抗癌剤の効果) 親細胞 (U-2 OS)、MDR に変異した細胞 (U-2 OS/DX580) と MDR1 遺伝子を導入した U-2 OS 細胞 (U-2/DOX035) に対してドキソルビシン (doxorubicin) 処理をした 4 種の細胞について、抗癌剤の影響を調べた。抗癌剤ドキソルビシン (doxorubicin)、450ng/mL の存在下での細胞増殖の影響を調べた。その結果、図 4 に示すように親細胞 U-2 OS 細胞と遺伝子導入コントロール細胞 (U-2/Neo8) では抗癌剤によって細胞増殖が抑えられるのに対して、MDR に変異した細胞 (U-2 OS/DX580) と MDR1 遺伝子を導入した U-2 OS 細胞 (U-2/DOX035) の場合には抗癌剤の効果はなく細

胞増殖が120時間以上続いた（図4）。

【0047】

上記の実験で得られた各経時的に得られた細胞のmRNA発現レベルの解析を行った。本発明の新規遺伝子RB1CC1遺伝子、RB1遺伝子及びMDR1遺伝子を、RB1遺伝子の発現レベルをヒトRB1 mRNAのヌクレオチド配列336-675の部位にハイブリダイズするプローブを用いて検出した以外は実施例3と同様にそれぞれ解析した。その結果を図5に示した。抗癌剤の効果が認められた親細胞U-2 OS細胞と遺伝子導入コントロール細胞（U-2/Neo8）では、経時的にRB1CC1遺伝子の発現が低下していた。対照的に、MDRに変異した細胞（U-2 OS/DX580）とMDR1遺伝子を導入したU-2 OS細胞（U-2/DOX035）細胞においてはドキソルビシン（doxorubicin）処理によってRB1CC1遺伝子の発現レベルは抑制されず、RB1CC1遺伝子の発現が増加した。これらの細胞ではRB1CC1遺伝子の発現とRB1遺伝子の発現が相関していた（図5）。

【0048】

【実施例6】（本発明のRB1CC1遺伝子とRB1遺伝子の発現）種々の癌細胞におけるRB1CC1遺伝子とRB1遺伝子の発現を半定量RT-PCR法によって調べた。用いた細胞株は、SARG、IOR/OS9、10、14、15、18、MOS、（これらは進行したヒト骨肉種の手術試料から得た）、Saos-2、HOS、MCF-7、T-47D、BT-20、SK-BR3、ZR75-1、MDA-MB-231、Daudi、Jurkat、K562（これらはアメリカンタイプカルチャーコレクションより購入）、NZK-K1（これは46才女性の乳癌組織より樹立した）、LK2、QG56、EBC1及びSBC2（これらは愛知ガンセンターの成田達彦博士より分与された）である。各細胞株より2 μ gのRNAを抽出し、RT-PCRを22-30サイクルかけて増幅した。RB1遺伝子用のプライマーは公知のプライマーを合成して用いた（Sauerbreyら、1996年）。RB1CC1増幅用プライマー対は配列表・配列番号19及び20（CC1-SとCC1-AS）の組み合わせを用いた。コントロールとして β 2ミクログロブリンを用いた。これら全ての細胞でRB1CC1遺伝子の発現はRB1遺伝子の発現と強く相関した。正常リンパ球1例と6例の癌細胞T-47D、MCF7、NZK-K1、Daudi、K5

62、Jurkatの結果を図6に示した(図6)。

【0049】

【実施例7】(臓器での本発明のRB1CC1遺伝子とRB1遺伝子の発現) ヒトの脳、心臓、骨格筋、大腸、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤、肺、リンパ球の各非腫瘍組織中に発現しているRB1CC1遺伝子とRB1遺伝子を市販のMTN Blots (Clontech社製) を用いてノーザンブロット解析によって行った。その結果を図7に示した。心臓および骨格筋では両遺伝子は強く発現しており、大腸、小腸、肺及びリンパ球では発現は弱かった。しかし、RB1CC1遺伝子とRB1遺伝子の発現は相関していた。一方マウスの心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、筋肉、腎臓、睾丸の各組織中に発現しているRb1cc1遺伝子をノーザンブロット解析した。その結果を図8に示した。心臓では6.2-kbと6.8-kbの転写産物が強く発現しており、腎臓、肝臓および筋肉で若干の発現が認められた。睾丸では6.2-kbの発現が主であり、肺及び脾臓では発現は弱かった(図7、図8)。

【0050】

【実施例8】(本発明のRB1CC1遺伝子導入によるRB1遺伝子の発現) 実施例6で示した細胞の中でRB1CC1遺伝子及びRB1遺伝子の両方が弱い発現レベルであったJurkat及びK562細胞にRB1CC1遺伝子を外から導入して、RB1遺伝子の発現レベルの変化を調べた。RB1CC1分子の完全なコード領域を含む4.9-kbをpCR3.1-Uniベクター(Invitrogen社製)に組み込み、クローニングしてRB1CC1発現ベクター(pCR-RB1CC)を調製した。調製した発現ベクターをK562及びJurkat細胞に組み込みRB1CC1形質転換細胞を調製した。対照としてpCR3.1-UniベクターにlacZ遺伝子を組み込んだものを調製した。親細胞と形質転換細胞(RB1CC1遺伝子導入細胞)のそれぞれのRB1CC1遺伝子とRB1遺伝子の発現レベルを実施例6と同様に操作して調べた。その結果を図9に示した。未転換の細胞及びlacZ遺伝子を組み込んだ細胞ではRB1CC1遺伝子及びRB1遺伝子ともに発現は弱い、RB1CC1遺伝子を組み込んだ細胞ではRB1CC1遺伝子はいくぶんRB1遺伝子も強く発現されていることが判り、RB1CC1遺伝子の導入(外来性発現)によりRB1遺伝子の発現も誘導されることが示された(図9)。

【 0 0 5 1 】

【実施例 9】（本発明のRB1CC1遺伝子のRB1遺伝子プロモーター転写活性）RB1CC1遺伝子の導入がRB1遺伝子のプロモーター領域の転写活性を増強制御していることを調べた。約 2 - k b の R B 1 プロモーター領域の遺伝子をプライマー対、5' - G A A G A T C T T T G A A A T T C C T C C T G C A C C A - 3' (Bgl.RbPro-S) と 5' - C C C A A G C T T A G C C A G C G A G C T G T G G A G - 3' (Hind.RbPro-AS) で増幅させ、P i c a G e n e B a s i c ベクター 2 (東洋インク製) に組み込んだ。そして、RB1プロモーターが蛍ルシフェラーゼの発現を支配している pGV-R b P r o ベクターを調製した。調製した pGV-R b P r o ベクターはさらに、内部コントロールとしてシーパンジールシフェラーゼ遺伝子をコードする p R L - S V 4 0 で重転換させて、K 5 6 2 細胞に LIPOFECTAMINE PLUS 試薬 (GIBCO 社製) を用いて組み込んだ。48 時間後に東洋インク社製の 2 重ルシフェラーゼ分析システムを用いて分析したところ、RB1CC1 遺伝子を導入した K562 細胞ではコントロールの lac Z を組み込んだ K 5 6 2 細胞に比べて強いルシフェラーゼ活性を示し、RB1CC1 遺伝子の導入が RB1 遺伝子プロモーターの転写活性を強めることが判った (図 10)。

【 0 0 5 2 】

【実施例 10】（原発性乳癌における RB1CC1 遺伝子のローカス (D 8 S 5 6 7) でのヘテロ接合性の消失) 癌組織の DNA 試料及び同一患者のゲノム DNA を PCR により増幅した試料を尿素変性 8 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。電気泳動後、銀染色により得られた結果を図 11 に示した。何れの患者でもゲノム DNA では 2 本のバンドが認められ、ヘテロ接合性が保持されているのに対して、5 例の癌組織の DNA で 1 本のバンドしか検出されず、ヘテロ接合性の消失を認めた (図 11)。

【 0 0 5 3 】

【実施例 11】（乳癌における本発明の RB1CC1 遺伝子の変異解析）
実施例 1 で用いた配列番号 6 及び 25 のプライマー対 (CC1-S2 と CC1-AS2) により E L O N G A S E システム (G I B C O 社製) を用いて増幅した

cDNA試料を、ABI PRISM 310型遺伝子解析装置、および配列表・配列番号7~24のプライマーを用いて、遺伝子配列を解析することによりRB1CC1遺伝子の変異を同定した。その結果35例の乳癌中7例の変異例を確認し、9種類の変異型を確認した。更にこれを配列番号38~52のプライマーを使って再確認した。その結果を表2に示した。

【表2】

表2 原発性乳癌におけるRB1CC1遺伝子の変異								
試料名	ヌクレオチド変異	存在部位 (コドン)	予測される 影響	ゲノム DNA	RB1CC1遺伝子の状態		RB1の状態	
					対立遺伝子	蛋白質	LOH	蛋白質
MMK3	c.11_4800del c.325_1985del	3-24 5-31	Y98X P109delX122	天然型	複製ヘテロ接合欠損	(-)	(-)	↓↓
MMK6	c.10_4798del c.123_4663del	3-24 9-23	Y46X48 D411delX431	天然型	複製ヘテロ接合欠損	(-)	(-)	(-)
MMK1	c.997_4783del	7-24	N319delX368	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	↓↓
MMK15	c.163_4719del	12-24	S345delX357	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	(-)
MMK31	c.212_4811del	3-24	T716X111	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	(-)
MMK38	c.241_4621del	3-23	C816X99	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	↓↓
MMK40	c.391_4679del	7-23	S197delX212	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	↓↓

(-): absent, ↓↓: significantly decreased.
LOH: ヘテロ接合性消失

【0054】

【実施例12】

実施例11で解析した試料のうちRB1CC1遺伝子に変異の求められたMMK6と認められなかったMMK29についてPCR産物を分析した結果とそれに対応する遺伝子配列解析結果を図12に示した。その結果、変異のないMMK29では4.9-kbの遺伝子が発現されているのに対して変異のあるMMK6では4.9-kbの発現は認められず断片遺伝子(1456bpと98bp)の発現が認められた(図12)。

【0055】

【実施例13】(ウエスタンブロットによる解析)

実施例11で解析した試料のうちRB1CC1遺伝子に変異を認めた3種の癌(MMK6、MMK40、MMK38)及び変異を認めなかった2例(MMK12、MMK29)について、新規蛋白質RB1CC1とRB1蛋白質の発現をウエスタンブロットで確

認した。抽出蛋白質を5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、P V D F メンブランに転写し、実施例4で調製した抗ヒトRB1CC1抗血清 (α -RB 1 CC-642) を反応させた。RB1蛋白質は抗RB1モノクローナル抗体 (G3-245; PharMingen社製) を反応させた。反応後、検出はECL試薬 (Amersham社製) で行った。その結果を図13に示した。変異のないMMK12とMMK29においては180kDaの分子量を持つ新規蛋白質RB1CC1と110~116kDaのRB1蛋白質の両蛋白質が発現しているのに対して、変異のある3例では何れも両蛋白質の発現は認められなかった(図13)。

【0056】

【実施例14】(免疫組織染色) 実施例11で解析した試料のうちRB1CC1遺伝子に変異を認めた2種の癌(MMK3、MMK6)及び変異を認めなかった1例(MMK12)の免疫組織染色を行った。反応させる抗体は実施例13と同じ抗体を用い、それぞれの癌試料から得たパラフィン固定ブロックより調製した組織切片に抗体を反応させた。図14に示したように新規蛋白質RB1CC1とRB1蛋白質の発現レベルは相関しており、RB1CC1遺伝子に変異を認めた2種の癌(MMK3、MMK6)では変異を認めなかった1例(MMK12)よりも明らかにその発現レベルは低下していることが確認された(図14)。

【0057】

【発明の効果】本発明の新規遺伝子(RB1CC1遺伝子)及びその蛋白質(RB1CC1)を検査することにより、癌細胞の増殖及び癌の診断に有用な情報を提供できる。

【0058】

【図面の簡単な説明】

【図1】

ヒトRB1CC1遺伝子とMDR1遺伝子の発現の関連を調べたノーザンプロットの写真である。

【図2】

ヒトRB1CC1蛋白質が核に存在していることを示すウエスタンプロットと細胞の免疫染色の写真である。

【図3】

マウスRb1cc1蛋白質が核に存在していることを示すウエスタンブロットと細胞の免疫染色の写真である。

【図 4】

抗癌剤ドキソルビシン処理による細胞増殖の効果を調べた図である。

【図 5】

抗癌剤ドキソルビシン処理による細胞増殖とRB1CC1遺伝子の発現とRB1遺伝子の発現の関連を調べたノーザンブロットの写真である。

【図 6】

各種癌細胞におけるRB1CC1遺伝子の発現とRB1遺伝子の発現の関連を調べた R T - P C R 産物の電気泳動写真である。

【図 7】

ヒト各種臓器におけるRB1CC1遺伝子の発現とRB1遺伝子の発現の関連を調べたノーザンブロットの写真である。

【図 8】

マウス各種臓器におけるRB1CC1遺伝子の発現とRB1遺伝子の発現の関連を調べたノーザンブロットの写真である。

【図 9】

RB1CC1遺伝子導入によるRB1遺伝子発現効果を調べた R T - P C R 産物の電気泳動写真である。

【図 1 0】

RB1遺伝子プロモーター領域の転写活性に及ぼすRB1CC1遺伝子誘導の効果を調べた結果の図である。

【図 1 1】

各種の原発性乳癌におけるRB1CC1遺伝子ローカスのヘテロ接合性の消失の検査結果の写真である。

【図 1 2】

原発性乳癌におけるRB1CC1遺伝子の変異を調べた R T - P C R 産物の電気泳動の写真と遺伝子配列解析結果の図である。

【図 1 3】

原発性乳癌におけるRB1CC1蛋白質とRB1蛋白質の発現を調べたウエスタンブロットの写真である。

【図 1 4】

原発性乳癌におけるRB1CC1蛋白質とRB1蛋白質の発現を調べた免疫組織染色の写真である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Chano Tokuhiho, Okabe Hidetoshi

<120> RB1 gene induced protein and gene thereof

<130> SUMS001

<160> 132

<210> 1

<211> 1594

<212> PRT

<213> human RB1CC1

<400> 1

Met Lys Leu Tyr Val Phe Leu Val Asn Thr Gly Thr Thr Leu Thr Phe

1 5 10 15

Asp Thr Glu Leu Thr Val Gln Thr Val Ala Asp Leu Lys His Ala Ile

20 25 30

Gln Ser Lys Tyr Lys Ile Ala Ile Gln His Gln Val Leu Val Val Asn

35 40 45

Gly Gly Glu Cys Met Ala Ala Asp Arg Arg Val Cys Thr Tyr Ser Ala

50 55 60

Gly Thr Asp Thr Asn Pro Ile Phe Leu Phe Asn Lys Glu Met Ile Leu

65 70 75 80

Cys Asp Arg Pro Pro Ala Ile Pro Lys Thr Thr Phe Ser Thr Glu Asn

85 90 95

Asp Met Glu Ile Lys Val Glu Glu Ser Leu Met Met Pro Ala Val Phe

100 105 110

His Thr Val Ala Ser Arg Thr Gln Leu Ala Leu Glu Met Tyr Glu Val

115 120 125

Ala Lys Lys Leu Cys Ser Phe Cys Glu Gly Leu Val His Asp Glu His

130

135

140

Leu Gln His Gln Gly Trp Ala Ala Ile Met Ala Asn Leu Glu Asp Cys

145

150

155

160

Ser Asn Ser Tyr Gln Lys Leu Leu Phe Lys Phe Glu Ser Ile Tyr Ser

165

170

175

Asn Tyr Leu Gln Ser Ile Glu Asp Ile Lys Leu Lys Leu Thr His Leu

180

185

190

Gly Thr Ala Val Ser Val Met Ala Lys Ile Pro Leu Leu Glu Cys Leu

195

200

205

Thr Arg His Ser Tyr Arg Glu Cys Leu Gly Arg Leu Asp Ser Leu Pro

210

215

220

Glu His Glu Asp Ser Glu Lys Ala Glu Thr Lys Arg Ser Thr Glu Leu

225

230

235

240

Val Leu Ser Pro Asp Met Pro Arg Thr Thr Asn Glu Ser Leu Leu Thr

245

250

255

Ser Phe Pro Lys Ser Val Glu His Val Ser Pro Asp Thr Ala Asp Ala

260

265

270

Glu Ser Gly Lys Glu Ile Arg Glu Ser Cys Gln Ser Thr Val His Gln

275

280

285

Gln Asp Glu Thr Thr Ile Asp Thr Lys Asp Gly Asp Leu Pro Phe Phe
290 295 300

Asn Val Ser Leu Leu Asp Trp Ile Asn Val Gln Asp Arg Pro Asn Asp
305 310 315 320

Val Glu Ser Leu Val Arg Lys Cys Phe Asp Ser Met Ser Arg Leu Asp
325 330 335

Pro Arg Ile Ile Arg Pro Phe Ile Ala Glu Cys Arg Gln Thr Ile Ala
340 345 350

Lys Leu Asp Asn Gln Asn Met Lys Ala Ile Lys Gly Leu Glu Asp Arg
355 360 365

Leu Tyr Ala Leu Asp Gln Met Ile Ala Ser Cys Gly Arg Leu Val Asn
370 375 380

Glu Gln Lys Glu Leu Ala Gln Gly Phe Leu Ala Asn Gln Lys Arg Ala
385 390 395 400

Glu Asn Leu Lys Asp Ala Ser Val Leu Pro Asp Leu Cys Leu Ser His
405 410 415

Ala Asn Gln Leu Met Ile Met Leu Gln Asn His Arg Lys Leu Leu Asp
420 425 430

Ile Lys Gln Lys Cys Thr Thr Ala Lys Gln Glu Leu Ala Asn Asn Leu
435 440 445

His Val Arg Leu Lys Trp Cys Cys Phe Val Met Leu His Ala Asp Gln

450

455

460

Asp Gly Glu Lys Leu Gln Ala Leu Leu Arg Leu Val Ile Glu Leu Leu

465

470

475

480

Glu Arg Val Lys Ile Val Glu Ala Leu Ser Thr Val Pro Gln Met Tyr

485

490

495

Cys Leu Ala Val Val Glu Val Val Arg Arg Lys Met Phe Ile Lys His

500

505

510

Tyr Arg Glu Trp Ala Gly Ala Leu Val Lys Asp Gly Lys Arg Leu Tyr

515

520

525

Glu Ala Glu Lys Ser Lys Arg Glu Ser Phe Gly Lys Leu Phe Arg Lys

530

535

540

Ser Phe Leu Arg Asn Arg Leu Phe Arg Gly Leu Asp Ser Trp Pro Pro

545

550

555

560

Ser Phe Cys Thr Gln Lys Pro Arg Lys Phe Asp Cys Glu Leu Pro Asp

565

570

575

Ile Ser Leu Lys Asp Leu Gln Phe Leu Gln Ser Phe Cys Pro Ser Glu

580

585

590

Val Gln Pro Phe Leu Arg Val Pro Leu Leu Cys Asp Phe Glu Pro Leu

595

600

605

His Gln His Val Leu Ala Leu His Asn Leu Val Lys Ala Ala Gln Ser

610

615

620

Leu Asp Glu Met Ser Gln Thr Ile Thr Asp Leu Leu Ser Glu Gln Lys

625

630

635

640

Ala Ser Val Ser Gln Thr Ser Pro Gln Ser Ala Ser Ser Pro Arg Met

645

650

655

Glu Ser Thr Ala Gly Ile Thr Thr Thr Thr Ser Pro Arg Thr Pro Pro

660

665

670

Pro Leu Thr Val Gln Asp Pro Leu Cys Pro Ala Val Cys Pro Leu Glu

675

680

685

Glu Leu Ser Pro Asp Ser Ile Asp Ala His Thr Phe Asp Phe Glu Thr

690

695

700

Ile Pro His Pro Asn Ile Glu Gln Thr Ile His Gln Val Ser Leu Asp

705

710

715

720

Leu Asp Ser Leu Ala Glu Ser Pro Glu Ser Asp Phe Met Ser Ala Val

725

730

735

Asn Glu Phe Val Ile Glu Glu Asn Leu Ser Ser Pro Asn Pro Ile Ser

740

745

750

Asp Pro Gln Ser Pro Glu Met Met Val Glu Ser Leu Tyr Ser Ser Val
755 760 765

Ile Asn Ala Ile Asp Ser Arg Arg Met Gln Asp Thr Asn Val Cys Gly
770 775 780

Lys Glu Asp Phe Gly Asp His Thr Ser Leu Asn Val Gln Leu Glu Arg
785 790 795 800

Cys Arg Val Val Ala Gln Asp Ser His Phe Ser Ile Gln Thr Ile Lys
805 810 815

Glu Asp Leu Cys His Phe Arg Thr Phe Val Gln Lys Glu Gln Cys Asp
820 825 830

Phe Ser Asn Ser Leu Lys Cys Thr Ala Val Glu Ile Arg Asn Ile Ile
835 840 845

Glu Lys Val Lys Cys Ser Leu Glu Ile Thr Leu Lys Glu Lys His Gln
850 855 860

Lys Glu Leu Leu Ser Leu Lys Asn Glu Tyr Glu Gly Lys Leu Asp Gly
865 870 875 880

Leu Ile Lys Glu Thr Glu Glu Asn Glu Asn Lys Ile Lys Lys Leu Lys
885 890 895

Gly Glu Leu Val Cys Leu Glu Glu Val Leu Gln Asn Lys Asp Asn Glu
900 905 910

Phe Ala Leu Val Lys His Glu Lys Glu Ala Val Ile Cys Leu Gln Asn

915

920

925

Glu Lys Asp Gln Lys Leu Leu Glu Met Glu Asn Ile Met His Ser Gln

930

935

940

Asn Cys Glu Ile Lys Glu Leu Lys Gln Ser Arg Glu Ile Val Leu Glu

945

950

955

960

Asp Leu Lys Lys Leu His Val Glu Asn Asp Glu Lys Leu Gln Leu Leu

965

970

975

Arg Ala Glu Leu Gln Ser Leu Glu Gln Ser His Leu Lys Glu Leu Glu

980

985

990

Asp Thr Leu Gln Val Arg His Ile Gln Glu Phe Glu Lys Val Met Thr

995

1000

1005

Asp His Arg Val Ser Leu Glu Glu Leu Lys Lys Glu Asn Gln Gln Ile

1010

1015

1020

Ile Asn Gln Ile Gln Glu Ser His Ala Glu Ile Ile Gln Glu Lys Glu

1025

1030

1035

1040

Lys Gln Leu Gln Glu Leu Lys Leu Lys Val Ser Asp Leu Ser Asp Thr

1045

1050

1055

Arg Cys Lys Leu Glu Val Glu Leu Ala Leu Lys Glu Ala Glu Thr Asp

1060

1065

1070

Glu Ile Lys Ile Leu Leu Glu Glu Ser Arg Ala Gln Gln Lys Glu Thr

1075

1080

1085

Leu Lys Ser Leu Leu Glu Gln Glu Thr Glu Asn Leu Arg Thr Glu Ile

1090

1095

1100

Ser Lys Leu Asn Gln Lys Ile Gln Asp Asn Asn Glu Asn Tyr Gln Val

1105

1110

1115

1120

Gly Leu Ala Glu Leu Arg Thr Leu Met Thr Ile Glu Lys Asp Gln Arg

1125

1130

1135

Ile Ser Glu Leu Ile Ser Arg His Glu Glu Glu Ser Asn Ile Leu Lys

1140

1145

1150

Ala Glu Leu Asn Lys Val Thr Ser Leu His Asn Gln Ala Phe Glu Ile

1155

1160

1165

Glu Lys Asn Leu Lys Glu Gln Ile Ile Glu Leu Gln Ser Lys Leu Asp

1170

1175

1180

Ser Glu Leu Ser Ala Leu Glu Arg Gln Lys Asp Glu Lys Ile Thr Gln

1185

1190

1195

1200

Gln Glu Glu Lys Tyr Glu Ala Ile Ile Gln Asn Leu Glu Lys Asp Arg

1205

1210

1215

Gln Lys Leu Val Ser Ser Gln Glu Gln Asp Arg Glu Gln Leu Ile Gln
 1220 1225 1230

Lys Leu Asn Cys Glu Lys Asp Glu Ala Ile Gln Thr Ala Leu Lys Glu
 1235 1240 1245

Phe Lys Leu Glu Arg Glu Val Val Glu Lys Glu Leu Leu Glu Lys Val
 1250 1255 1260

Lys His Leu Glu Asn Gln Ile Ala Lys Ser Pro Ala Ile Asp Ser Thr
 1265 1270 1275 1280

Arg Gly Asp Ser Ser Ser Leu Val Ala Glu Leu Gln Glu Lys Leu Gln
 1285 1290 1295

Glu Glu Lys Ala Lys Phe Leu Glu Gln Leu Glu Glu Gln Glu Lys Arg
 1300 1305 1310

Lys Asn Glu Glu Met Gln Asn Val Arg Thr Ser Leu Ile Ala Glu Gln
 1315 1320 1325

Gln Thr Asn Phe Asn Thr Val Leu Thr Arg Glu Lys Met Arg Lys Glu
 1330 1335 1340

Asn Ile Ile Asn Asp Leu Ser Asp Lys Leu Lys Ser Thr Met Gln Gln
 1345 1350 1355 1360

Gln Glu Arg Asp Lys Asp Leu Ile Glu Ser Leu Ser Glu Asp Arg Ala
 1365 1370 1375

Arg Leu Leu Glu Glu Lys Lys Lys Leu Glu Glu Glu Val Ser Lys Leu
1380 1385 1390

Arg Ser Ser Ser Phe Val Pro Ser Pro Tyr Val Ala Thr Ala Pro Glu
1395 1400 1405

Leu Tyr Gly Ala Cys Ala Pro Glu Leu Pro Gly Glu Ser Asp Arg Ser
1410 1415 1420

Ala Val Glu Thr Ala Asp Glu Gly Arg Val Asp Ser Ala Met Glu Thr
1425 1430 1435 1440

Ser Met Met Ser Val Gln Glu Asn Ile His Met Leu Ser Glu Glu Lys
1445 1450 1455

Gln Arg Ile Met Leu Leu Glu Arg Thr Leu Gln Leu Lys Glu Glu Glu
1460 1465 1470

Asn Lys Arg Leu Asn Gln Arg Leu Met Ser Gln Ser Met Ser Ser Val
1475 1480 1485

Ser Ser Arg His Ser Glu Lys Ile Ala Ile Arg Asp Phe Gln Val Gly
1490 1495 1500

Asp Leu Val Leu Ile Ile Leu Asp Glu Arg His Asp Asn Tyr Val Leu
1505 1510 1515 1520

Phe Thr Val Ser Pro Thr Leu Tyr Phe Leu His Ser Glu Ser Leu Pro

1525

1530

1535

Ala Leu Asp Leu Lys Pro Gly Glu Gly Ala Ser Gly Ala Ser Arg Arg

1540

1545

1550

Pro Trp Val Leu Gly Lys Val Met Glu Lys Glu Tyr Cys Gln Ala Lys

1555

1560

1565

Lys Ala Gln Asn Arg Phe Lys Val Pro Leu Gly Thr Lys Phe Tyr Arg

1570

1575

1580

Val Lys Ala Val Ser Trp Asn Lys Lys Val

1585

1590

<210> 2

<211> 1588

<212> PRT

<213> mouse Rblcc1

<400> 2

Met Lys Leu Tyr Val Phe Leu Val Asn Thr Gly Thr Thr Leu Thr Phe

1

5

10

15

Asp Thr Glu Leu Thr Val Gln Thr Val Ala Asp Leu Lys His Ala Ile

20

25

30

Gln Ser Lys Tyr Lys Ile Ala Ile Gln His Gln Val Leu Val Val Asn

35

40

45

Gly Gly Glu Cys Met Ala Ala Asp Arg Arg Val Cys Thr Tyr Ser Ala

50

55

60

Gly Thr Asp Thr Asn Pro Ile Phe Leu Phe Asn Lys Glu Met Ile Leu
65 70 75 80

Cys Asp Arg Ala Pro Ala Ile Pro Lys Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asn
85 90 95

Asp Met Glu Ile Lys Val Glu Glu Ser Leu Met Met Pro Ala Val Phe
100 105 110

His Thr Val Ala Ser Arg Thr Gln Leu Ala Val Glu Met Tyr Asp Val
115 120 125

Ala Lys Lys Leu Cys Ser Phe Cys Glu Gly Leu Val His Asp Glu His
130 135 140

Leu Gln His Gln Gly Trp Ala Ala Ile Met Ala Asn Leu Glu Asp Cys
145 150 155 160

Ser Asn Ser Tyr Gln Lys Leu Leu Phe Lys Phe Glu Ser Ile Tyr Ser
165 170 175

Asp Tyr Leu Gln Ser Ile Glu Asp Ile Lys Leu Lys Leu Thr His Leu
180 185 190

Gly Thr Ala Val Ser Val Met Ala Lys Ile Pro Leu Leu Glu Cys Leu
195 200 205

Thr Arg His Ser Tyr Arg Glu Cys Leu Gly Arg Pro Asp Ser Leu Asn

210

215

220

Glu His Glu Gly Ser Glu Lys Ala Glu Met Lys Arg Ser Thr Glu Leu

225

230

235

240

Val Leu Ser Pro Asp Met Pro Arg Thr Thr Asn Thr Ser Leu Val Thr

245

250

255

Ser Phe His Lys Ser Met Glu His Val Ala Pro Asp Pro Thr Gly Thr

260

265

270

Glu Arg Gly Lys Glu Leu Arg Glu Ser Cys Gln Ser Thr Val Gln Gln

275

280

285

Glu Glu Ala Ser Val Asp Ala Lys Asp Ser Asp Leu Pro Phe Phe Asn

290

295

300

Val Ser Leu Leu Asp Trp Ile Asn Val Gln Asp Arg Pro Asn Asp Val

305

310

315

320

Glu Ser Leu Val Arg Lys Cys Phe Asp Ser Met Ser Arg Leu Asp Pro

325

330

335

Lys Ile Ile Gln Pro Phe Met Leu Glu Cys His Gln Thr Ile Ala Lys

340

345

350

Leu Asp Asn Gln Asn Met Lys Ala Ile Lys Gly Leu Glu Asp Arg Leu

355

360

365

Tyr Ala Leu Asp Gln Met Ile Ala Ser Cys Ser Arg Leu Val Asn Glu
370 375 380

Gln Lys Glu Leu Ala Gln Gly Phe Leu Ala Asn Gln Met Arg Ala Glu
385 390 395 400

Asn Leu Lys Asp Ala Ser Val Leu Pro Asp Leu Cys Leu Ser His Ala
405 410 415

Asn Gln Leu Met Ile Met Leu Gln Asn His Arg Lys Leu Leu Asp Ile
420 425 430

Lys Gln Lys Cys Thr Thr Ala Lys Gln Glu Leu Ala Asn Asn Leu His
435 440 445

Val Arg Leu Lys Trp Cys Cys Phe Val Met Leu His Ala Asp Gln Asp
450 455 460

Gly Glu Lys Leu Gln Ala Leu Leu Arg Leu Val Ile Glu Leu Leu Glu
465 470 475 480

Arg Val Arg Ile Val Glu Ala Leu Ser Thr Val Pro Gln Met Tyr Cys
485 490 495

Leu Ala Val Val Glu Val Val Arg Arg Lys Met Phe Ile Lys His Tyr
500 505 510

Arg Glu Trp Ala Gly Ala Leu Val Lys Asp Gly Lys Gln Leu Tyr Glu
515 520 525

Ala Glu Lys Ser Lys Arg Glu Ser Phe Gly Lys Leu Phe Arg Lys Ser
530 535 540

Phe Leu Arg Asn Arg Leu Phe Lys Gly Leu Asp Ser Trp Pro Ser Ser
545 550 555 560

Phe Cys Thr Gln Lys Pro Arg Lys Phe Asp Cys Glu Leu Pro Asp Ile
565 570 575

Ser Leu Lys Asp Leu Gln Phe Leu Gln Ser Phe Cys Pro Ser Glu Val
580 585 590

Gln Pro Phe Leu Arg Val Pro Leu Leu Cys Asp Phe Glu Pro Leu His
595 600 605

Gln His Val Leu Ala Leu His Asn Leu Val Lys Ala Ala Gln Ser Leu
610 615 620

Asp Glu Met Ser Gln Thr Ile Thr Asp Leu Leu Asn Glu Gln Lys Val
625 630 635 640

Ser Thr Ser Gln Ala Ser Pro Gln Ser Ala Ala Ser Pro Arg Ile Glu
645 650 655

Ser Thr Thr Gly Ile Thr Thr Thr Thr Ser Pro Lys Thr Pro Pro Pro
660 665 670

Leu Thr Val Gln Asp Thr Leu Cys Pro Ala Val Cys Pro Leu Glu Glu

675

680

685

Leu Ser Pro Asp Ser Ile Asp Ala His Thr Phe Asp Phe Glu Thr Ile

690

695

700

Ser His Pro Asn Thr Glu Gln Pro Val His Gln Ala Ser Ile Asp Leu

705

710

715

720

Asp Ser Leu Ala Glu Ser Pro Glu Ser Asp Phe Met Ser Ala Val Asn

725

730

735

Glu Phe Val Ile Glu Glu Asn Leu Ser Ser Pro Asn Pro Ile Ser Asp

740

745

750

Pro Gln Ser Pro Glu Met Met Val Glu Ser Leu Tyr Ser Ser Val Ile

755

760

765

Asn Ala Ile Asp Ser Arg Arg Met Gln Asp Thr Ser Thr Arg Gly Asn

770

775

780

Glu Gly Phe Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Gln Leu Glu Lys Cys

785

790

795

800

Arg Ala Ala Ala Gln Asp Ser His Thr Ser Ile Gln Thr Ile Lys Asp

805

810

815

Asp Leu Cys His Phe Arg Thr Phe Val Gln Lys Glu Gln Cys Asp Leu

820

825

830

Ala Asn Tyr Leu Lys Cys Thr Ala Val Glu Ile Arg Asn Ile Ile Glu
835 840 845

Lys Val Lys Cys Ser Leu Glu Ile Thr Leu Lys Glu Lys His Gln Gln
850 855 860

Glu Leu Gln Ser Leu Lys Ile Glu Tyr Glu Cys Lys Leu Asp Ala Leu
865 870 875 880

Val Lys Asp Ser Glu Glu Asn Val Asn Lys Ile Leu Lys Leu Lys Glu
885 890 895

Asn Leu Val Ser Leu Glu Glu Ala Leu Gln Asn Lys Asp Asn Glu Phe
900 905 910

Thr Ser Ile Lys His Glu Lys Asp Ala Ile Val Cys Val Gln Gln Glu
915 920 925

Lys Asp Gln Lys Leu Leu Glu Met Glu Lys Ile Met His Thr Gln His
930 935 940

Cys Glu Ile Lys Glu Leu Lys Gln Ser Arg Glu Met Ala Leu Glu Asp
945 950 955 960

Leu Lys Lys Leu His Asp Glu Lys Ile Glu Ser Leu Arg Ala Glu Phe
965 970 975

Gln Cys Leu Glu Glu Asn His Leu Lys Glu Leu Glu Asp Thr Leu His
980 985 990

Ile Arg His Thr Gln Glu Phe Glu Lys Val Met Thr Asp His Asn Met

995 1000 1005

Ser Leu Glu Lys Leu Lys Lys Glu Asn Gln Gln Arg Ile Asp Gln Met

1010 1015 1020

Leu Glu Ser His Ala Ser Thr Ile Gln Glu Lys Glu Gln Gln Leu Gln

1025 1030 1035 1040

Glu Leu Lys Leu Lys Val Ser Asp Leu Ser Asp Met Arg Cys Lys Leu

1045 1050 1055

Glu Val Glu Leu Ala Leu Lys Glu Ala Glu Thr Asp Glu Ile Lys Ile

1060 1065 1070

Leu Leu Glu Glu Ser Arg Thr Gln Gln Lys Glu Met Leu Lys Ser Leu

1075 1080 1085

Leu Glu Gln Glu Thr Glu Asn Leu Arg Thr Glu Ile Ser Lys Leu Asn

1090 1095 1100

Gln Lys Ile His Asp Asn Asn Glu Ser Tyr Gln Val Gly Leu Ser Glu

1105 1110 1115 1120

Leu Arg Ala Leu Met Thr Ile Glu Lys Asp Gln Cys Ile Ser Glu Leu

1125 1130 1135

Ile Ser Arg His Glu Glu Glu Ser Asn Ile Leu Lys Ala Glu Leu Asp

1140

1145

1150

Asn Val Thr Ser Leu His Arg Gln Ala Tyr Glu Ile Glu Lys Lys Leu

1155

1160

1165

Lys Glu Gln Ile Val Glu Leu Gln Thr Arg Leu Asn Ser Glu Leu Ser

1170

1175

1180

Ala Leu Glu Lys Gln Lys Asp Glu Lys Ile Thr Gln Gln Glu Glu Lys

1185

1190

1195

1200

Tyr Glu Ala Leu Ile Gln Asn Leu Glu Lys Asp Lys Glu Arg Leu Val

1205

1210

1215

Lys Asn His Glu Gln Asp Lys Glu His Leu Ile Gln Glu Leu Asn Phe

1220

1225

1230

Glu Lys Asn Lys Ala Val Gln Thr Ala Leu Asp Glu Phe Lys Val Glu

1235

1240

1245

Arg Glu Leu Val Glu Lys Glu Leu Leu Glu Lys Val Lys His Leu Glu

1250

1255

1260

Asn Gln Ile Ala Lys Thr Pro Ala Phe Glu Ser Ala Arg Glu Asp Ser

1265

1270

1275

1280

Ser Ser Leu Val Ala Glu Leu Gln Glu Lys Leu Gln Glu Glu Lys Ala

1285

1290

1295

Lys Phe Leu Glu Gln Leu Glu Glu Gln Glu Lys Arg Lys Asn Glu Glu

1300

1305

1310

Met Gln Asn Val Arg Thr Ser Leu Ile Ala Glu Gln Gln Thr Asn Phe

1315

1320

1325

Asn Thr Val Leu Thr Arg Glu Lys Met Arg Lys Glu Asn Ile Ile Asn

1330

1335

1340

Asp Leu Ser Asp Lys Leu Lys Ser Thr Met Gln Gln Gln Glu Arg Asp

1345

1350

1355

1360

Lys Asp Leu Ile Glu Ser Leu Ser Glu Asp Arg Ala Arg Leu Leu Glu

1365

1370

1375

Glu Lys Lys Gln Leu Glu Glu Glu Val Ser Lys Leu Arg Thr Ser Ser

1380

1385

1390

Phe Leu Ser Ser Ala Pro Val Ala Ala Ala Pro Glu Leu Tyr Gly Ala

1395

1400

1405

Cys Ala Pro Glu Leu Pro Gly Glu Pro Glu Arg Ser Val Met Glu Thr

1410

1415

1420

Ala Asp Glu Gly Arg Leu Asp Ser Ala Met Glu Thr Ser Met Met Ser

1425

1430

1435

1440

Val Gln Glu Asn Met Leu Ser Glu Glu Lys Gln Arg Ile Met Leu Leu

1445

1450

1455

Glu Arg Thr Leu Gln Leu Lys Glu Glu Glu Asn Lys Arg Leu Asn Gln

1460

1465

1470

Arg Leu Met Ser Gln Ser Leu Ser Ser Val Ser Ser Arg His Ser Glu

1475

1480

1485

Lys Ile Ala Ile Arg Asp Phe Gln Val Gly Asp Leu Val Leu Ile Ile

1490

1495

1500

Leu Asp Glu Arg His Asp Asn Tyr Val Leu Phe Thr Val Ser Pro Thr

1505

1510

1515

1520

Leu Tyr Phe Leu His Ser Glu Ser Leu Pro Ala Leu Asp Leu Lys Pro

1525

1530

1535

Gly Glu Gly Ala Ser Gly Ala Ser Arg Arg Pro Trp Val Leu Gly Lys

1540

1545

1550

Val Met Glu Lys Glu Tyr Cys Gln Ala Lys Lys Ala Gln Asn Arg Phe

1555

1560

1565

Lys Val Pro Leu Gly Thr Lys Phe Tyr Arg Val Lys Ala Val Ser Trp

1570

1575

1580

Asn Lys Lys Val

1585

<210> 3

<211> 6636

<212> DNA

<213> human RB1CC1 gene

<400> 3

gtcgacaata acaaaccaag ccgcggcggt gtccgcggcc ctgccgagcc ctcggcgttg 60
cctcagaatc ccccagtcgc ctgggcccct cggctctgac aggccgcggc cttctgtccc 120
ccggccccag acccagagcc gaggggcctg ctgcgctcct tgtccgcccg gaccctccc 180
tgcctcctag agttcggggc cgcggcgggc gggcgcccgg gacgccggcg gttgtgtcgg 240
cttagcggtg ccgaatgggc ggttggtaac cgctgccgag gactaggcgg cggcggaaga 300
tggtgccggg ggtcgctggc tctgctgctg ccgccggcga aggaggaggc gttgccggtt 360
ttctgagttt aaccagtaat gccattcagt tgccaatctc aagcaaagca aacataagcc 420
agttttaatc tactttttaa gaaaagtggg agtccttttc acagtgcctg acgtaactgt 480
atcagagggt gaggtataag ctacacagaat tcagataaat catcatgaag ttatatgtat 540
ttctggttaa cactggaact actctaacat ttgacactga acttacagtg caaactgtgg 600
cagaccttaa gcatgccatt caaagcaaat acaagattgc tattcaacac cagggtgctgg 660
tggtcaatgg aggagaatgc atggctgcag atcgaagagt gtgtacctac agtgctggga 720
cggatacaaa tccaattttt cttttaaca aagaaatgat cttatgcgat cgtccacctg 780
ctattcctaa aactaccttt tcgacagaaa atgacatgga aataaaagt gaagaatctc 840
ttatgatgcc tgcagttttt catactgttg cttcaaggac acagcttgca ttggaaatgt 900
atgaagtgc caagaaactt tgttctttt gtgaaggctt tgtacatgat gaacatcttc 960
aacaccaagg ctgggctgca atcatggcca acctggagga ctgttcaaat tcatacaaaa 1020
agctactttt caagtttgaa agtatttatt caaattatct gcagtcata gaagacatca 1080
agttaaaact tactcattta ggaactgcag tttcagtaat ggccaagatt ccactgttgg 1140
agtgcctaac cagacatagt tacagagaat gtttggaag actggattct ttacctgaac 1200
atgaagactc agaaaaagct gagacgaaaa gatccactga actgggtgctc tctcctgata 1260
tgcctagaac aactaacgaa tctttgttaa cctcatttcc caagtcagt gaacatgtgt 1320
ccccagatac cgcagatgct gaaagtggca aagaaattag ggaatcttgt caaagtactg 1380
ttcatcagca agatgaaact acgattgaca ctaaagatgg tgatctgccc ttttttaatg 1440
tctctttgtt agactggata aatgttcaag atagacctaa tgatgtggaa tcttttgtca 1500
ggaagtgcct tgattctatg agcaggcttg atccaaggat tattcgacca tttatagcag 1560

aatgccgtca aactattgcc aaacttgata atcagaatat gaaagccatt aaaggacttg 1620
aagatcggct ctacgccctg gaccagatga ttgctagctg tggccgactg gtgaatgaac 1680
agaaagagct tgctcagga tttttagcta atcagaagag agctgaaaac ttaaaggatg 1740
catctgtatt acctgattta tgcctgagtc acgcaaatca gttgatgatt atgttgcaaa 1800
atcatagaaa actgttagat attaagcaga agtgtaccac tgccaaacaa gaactagcaa 1860
ataacctaca tgtcagactg aagtgggtgtt gctttgtaat gcttcattgct gatcaagatg 1920
gagagaagtt acaagctttg ctccgcctcg taatagagct gttagaaaga gtcaaaattg 1980
ttgaagctct tagtacagtt cctcagatgt actgcttagc tgttggtgag gttgtaagaa 2040
gaaaaatgtt cataaaacac tacagggagt gggctgggtgc tttagtcaaa gatggaaaga 2100
gattatatga agcagaaaaa tcaaaaaggg aatcctttgg gaaattatit aggaagtctt 2160
ttttaagaaa tcgtctgttt aggggactgg actcctggcc cccttccttt tgtactcaaa 2220
agcctcgaaa gtttgactgt gaacttcag atatttcatt aaaagattta cagtttctgc 2280
aatcatittg tccttcggaa gttcagccat tcctcagggt tcccttactt tgtgactttg 2340
aacctctaca ccagcatgta cttgctctac ataatttggt aaaagcagca caaagtttg 2400
atgaaatgtc acagaccatt acagatctac tgagtgaaca aaaggcatct gtgagccaga 2460
catccccaca gtctgcttct tcaccaagga tggaaagtac agcaggaatt acaactacta 2520
cctcaccgag aactcctcca ccaactgactg ttcaggatcc cttatgtcct gcagtttgtc 2580
ccttagaaga attatctcca gatagtattg atgcacatac gtttgatttt gaaactattc 2640
cccatccaaa catagaacag actattcacc aagtttcttt agacttgat tcattagcag 2700
aaagtcctga atcagatttt atgtctgctg tgaatgagtt tgtaatagaa gaaaatttgt 2760
cgtctcctaa tcctataagt gatccacaaa gccagaaat gatgggtgaa tcactttatt 2820
catcagttat caatgcgata gacagtagac gaatgcagga tacaatgta tgtggttaagg 2880
aggatttttg agatcatact tctctgaatg tccagttgga aagatgtaga gttgttgccc 2940
aagactctca cttcagtata caaaccatta aggaagacct ttgccacttt agaactttg 3000
tacaaaaaga acagtgtgac ttctcaaatt cattaaaatg tacagcagta gaaataagaa 3060
acattattga aaaagtaaaa tgttctctgg aaataacact aaaagaaaaa catcaaaaag 3120
aactactgtc tttaaaaaat gaatatgaag gtaaacctga cggactaata aaggaaactg 3180
aagagaatga aaacaaaatt aaaaaattga agggagagtt agtatgcctt gaggaggttt 3240
tacaaaataa agataatgaa tttgctttgg ttaaacatga aaaagaagct gtaatctgcc 3300

tgcagaatga aaaggatcag aagttgtag agatggaaaa tataatgcac tctcaaaatt 3360
 gtgaaattaa agaactgaag cagtcacgag aaatagtgtt agaagactta aaaaagctcc 3420
 atgttgaaaa tgatgagaag ttacagttat tgagggcaga acttcagtcc ttggagcaaa 3480
 gtcattctaaa ggaattagag gacacacttc aggttaggca catacaagag tttgagaagg 3540
 ttatgacaga ccacagagtt tctttggagg aattaaaaaa ggaaaatcaa caaataatta 3600
 atcaaataca agaattctcat gctgaaatta tccaggaaaa agaaaaacag ttacaggaat 3660
 taaaactcaa ggtttctgat ttgtcagaca cgagatgcaa gttagagggtt gaacttgcgt 3720
 tgaaggaagc agaaactgat gaaataaaaa ttttctgga agaaagcaga gcccagcaga 3780
 aggagacctt gaaatctctt cttgaacaag agacagaaaa tttgagaaca gaaattagta 3840
 aactcaacca aaagattcag gataataatg aaaattatca ggtgggctta gcagagctaa 3900
 gaactttaat gacaattgaa aaagatcagc gtatttccga gttattagat agacatgaag 3960
 aagaatctaa tatacttaaa gctgaattaa acaaagtaac atctttgcat aaccaagcat 4020
 ttgaaataga aaaaaaccta aaagaacaaa taattgaact gcagagtaaa ttggattcag 4080
 aattgagtgc tcttgaaaga caaaaagatg aaaaaattac ccaacaagaa gagaaatacg 4140
 aagctattat ccagaacctt gagaaagaca gacaaaaatt ggtcagcagc caggagcaag 4200
 acagagaaca gttattcag aagcttaatt gtgaaaaaga tgaagctatt cagactgccc 4260
 taaaagaatt taaattggag agagaagttg ttgagaaaga gttattagaa aaagttaaac 4320
 atcttgagaa tcaaatagca aaaagtcttg ccattgactc taccagagga gattcttcaa 4380
 gcttagttgc tgaacttcaa gaaaagcttc aggaagaaaa agctaagttt ctagaacaac 4440
 ttgaagagca agaaaaaaga aagaatgaag aaatgcaaaa tggtcgaaca tctttgattg 4500
 cggaacaaca gaccaatttt aacactgttt taacaagaga gaaaatgaga aaagaaaaca 4560
 taataaatga tcttagtgat aagttgaaaa gtacaatgca gcaacaagaa cgggataaag 4620
 atttgataga gtcactttct gaagatcgag ctggttgct tgaggaaaag aaaaagcttg 4680
 aagaagaagt cagtaagttg cgcagtagca gttttgttc ttaccatat gtagctacag 4740
 cccagaact ttatggagct tgtgcacctg aactcccagg tgaatcagat agatccgctg 4800
 tggaacacgc agatgaagga agagtggatt cagcaatgga gacaagcatg atgtctgtac 4860
 aagaaaatat tcatatgttg tctgaagaaa aacagcgat aatgctgtta gaacgaacat 4920
 tgcaattgaa agaagaagaa aataaacggt taaatcaaag actgatgtct cagagcatgt 4980
 cttcagtatc ttcaaggcat tctgaaaaga tagctattag agattttcag gtgggagatt 5040

tggtagtcat catcctagac gaacgccatg acaattatgt gttatttact gtagtccta 5100
 ctttatatit tctacattca gagtctctac ctgccctgga tctcaaacca ggtgagggtg 5160
 cttcaggtgc atctagaaga ccctgggtac ttggaaaagt aatggaaaaa gaatactgtc 5220
 aagccaaaaa ggcacaaaac agatttaaag ttcctttggg gacaaagttt tacagagtga 5280
 aagccgtatc atggaataag aaagtataac ttatggacaa aattaatata ttctatgaca 5340
 tttttttctg attgtcctg cagtgtcat tcatcactcc aaaaacagca ggccatcttt 5400
 ttatgcaaaa gtcagcgtga caatatactt cactgggtga catcgtttac tttttaactg 5460
 gcttcatttt aggaataata aattcatcag aatccttggc tgaattaaaa tggtttttgt 5520
 tttttggttt ttttttttac ccagacaact ctagaaatgc ggaccaaact acttcatttt 5580
 ctcaaagggc ataccttgtg cattgtggct tatgatgagc catattaatt gcctgttaaa 5640
 tatacactag ctggaactta gatgttaaat gttattatta ccagcatttg tccttttgtg 5700
 aaatcagtat cagaatactt gcactcttta acacattctt tataaaatgt ataaattatt 5760
 cagaactatt taaaataaag aggagtgtta ttgcatgctg ataatcattt tgagtttgcc 5820
 tcagtagata ctaaagcaaa ttgtttcagt ttttttaa at gccctttgat gtttcaaaaa 5880
 aaaaaaggaa ctgtaatttg attgactgat ttaagatca gccataagta atcagcaatc 5940
 ttcaaaagca ctttcagtgg attggctatc tgggttctaa agggaagagt ctgtgctact 6000
 aaccatttca aatgcagact caaaccttcc caacatcttt atgactctag aataatcata 6060
 ttgatgaaat cgtaattcat ggttgagttt cagaacaaaa gatattcatt gcacattaac 6120
 catttagagg tcatttaa at aacaaaatat tgtattgtaa aagaactgta caattttaaa 6180
 acaataaaga tttgaacctg taaatgtgtg tgccttttaa agaaggatac atttttaata 6240
 tatttgagtg attgctggga agtgtgaaaa tattgttatg tatcatatca aagagaaaca 6300
 tgtttattac aaaaatgttc tttaactata tactatgtaa cagggtaaac agtgttatgt 6360
 agaatagaat tgtgtaaact agatctttag agaagttgcc attgagcaaa gttattttaa 6420
 tgagttagtt gagttggatg agaattgttt gaggtttgtt gctagagaac aataataaaa 6480
 taattctttt tcagaaaata tttaatttct tcataaaaat aagttaaata tttttttaa 6540
 tatgtatata taatagtaca aaatggaata aacatcatag tgtatagaaa actgaatttg 6600
 acaagttaat gaataaatga acaaatgatt tcaaaa 6636

<211> 6518

<212> DNA

<213> mouse Rblcc1 gene

<400> 4

ccgagtcgac aataacaaac cccacggcgg ccgcgaccca gccctgccaa gctctcagtg 60
cctcggccgg cggaactcggg tccccgcgcg gagccgaggg gccggagcag cggctgcgcc 120
cgactcccat ccttcggggc ctgcgccggg actcggcggc tgggcgccga cggttgtgtc 180
ggttggcggc gccgcagggg cggttgatag ccgccgccga ggccagggcg gcggcagaag 240
atggtgcgga gggccgccgg ctgtgttgct gccgcgggcg gaggaggcgc tgccggttct 300
ctgagtttca ccagtaatgc cactcagttg ccaatatcaa gcaagcgcac ataagacaat 360
tgtaatcttt taagaaaagt agtacttctc ttacacagtat ctggcggatc aacactggag 420
ggtgaggtgt cagcttccag aaagatcacc atgaagttat atgtgtttct ggtaaacacc 480
ggaaccacgc tgacatttga cactgagcta actgtgcaaa ctgtggctga tcttaagcat 540
gccattcaaa gcaaatacaa gattgctatt cagcaccagg ttctgggtgt caatggagga 600
gaatgcatgg ctgcagatcg aagagtgtgt acttacagcg ctgggacgga cacaatcca 660
atctttcttt ttaataaaga aatgatctta tgtgaccgtg cacctgctat tcctaaagct 720
accctttcaa cagaaaatga catggaaata aaagttgaag agtctcttat gatgcctgca 780
gttttccaca ctgttgcttc aaggacacag cttgcagtg aaatgtatga cgttgccaag 840
aagctctgct ctttctgtga agggcttgct catgatgaac atcttcagca ccaaggctgg 900
gctgcaatca tggccaatct ggaggactgt tcaaattcat accaaaaact tcttttcaag 960
tttgaaagta ttattctga ttatcttcaa tccatagaag acatcaagtt aaaacttact 1020
catttaggaa ctgctgtttc agtaatggcc aagattccac tattggagtg cctaaccaga 1080
catagttaca gggaatgttt gggaagaccg gattctttga atgaacatga aggctcagag 1140
aaagctgaga tgaaaagatc tactgaactg gtgctctctc ctgatatgcc tagaacaacg 1200
aacacatcct tggtaacctc atttcacaag tcaatggagc atgtagctcc agatcccacc 1260
ggtactgaac gtggcaaaga acttagggaa tcttgtcaaa gtactgtcca gcaagaagaa 1320
gcttcagtg atgctaaaga cagtatctg ccttttttta atgtttcttt gttagactgg 1380
ataaatgttc aagatagacc caatgatgtg gaatctctgg tcaggaagtg ctttgattct 1440
atgagcaggc ttgacccaaa gattattcaa ccatttatgt tagaatgcca tcaaactatt 1500

gccaaacttg ataatcagaa tatgaaagcc attaaagggc ttgaagatcg gctgtatgcc 1560
 ttggaccaga tgattgctag ctgtagccgg ctggtaaattg aacagaaaga gcttgctcag 1620
 ggatttttag ctaatcagat gagagctgaa aacttgaagg atgcatctgt gttacctgat 1680
 ctgtgtctga gtcattgcaaa tcaactaatg attatgttgc aaaaccacag aaaactgttg 1740
 gatattaaac agaagtgcac cactgccaaa caagagctag caaacaattct ccacgtcaga 1800
 ctgaagtggg gttgttttgg gatgcttcat gctgatcaag atggagaaaa actgcaggca 1860
 ctgctccgcc ttgtaataga gctgttagaa agagtcagaa ttgttgaggc tcttagtaca 1920
 gttcctcaga tgtattgcct agctgttggg gaggttgtaa gaagaaaaat gttcattaaa 1980
 cactacagag agtgggctgg tgcttttagtc aaagacggaa aacaactata tgaagctgaa 2040
 aagtcaaaaa gggaatcctt tgggaaatta tttaggaagt cttttttaag aaatcgtctg 2100
 tttaaaggac tggactcctg gccttcctca tttgtactc agaagcctcg aaaatttgac 2160
 tgtgaacttc cagatatatc attaaaagat ttacagtttc ttcaatcatt ttgtccttca 2220
 gaagtgcagc cattcctcag ggtcccctta cttgtgact ttgaacctct acaccagcat 2280
 gtacttgccc tacataattt ggtaaaagca gcacaaagtt tggatgaaat gtcacagact 2340
 attacagatc tcctaaatga acaaaaggta tccacaagtc aggcattccc acagtcagct 2400
 gcttctccaa gaatagaaag tacaacaggc attacaacca ctacctacc aaaaactcct 2460
 cctccactaa ctgttcagga caccttatgt cgggcagtgt gtcccttaga agaattatct 2520
 ccagatagta tcgatgtca tacatttgat ttcgaaacca tctcccatcc aaacacagaa 2580
 caacctgttc accaagcttc tatagacttg gattcattag cagaaagccc tgagtctgac 2640
 tttatgtctg ctgtgaatga gttgtgata gaagaaaatt tatcgtctcc aaaccctata 2700
 agtgatccac aaagtccaga aatgatgggag gagtcacttt actcttcagt catcaatgca 2760
 atagatagta ggcgtatgca agacacaagt acacgtggaa acgagggctt tggggatcgg 2820
 gctgctctac atgtccagct ggagaaatgc agagctgctg cacaagactc tcacaccagt 2880
 atacaaacca tcaaggacga tctgtgccat ttcagaacat ttgtacaaaa agaacagtgt 2940
 gacttagcaa attattttaa atgtacagct gtagaaataa gaaatattat tgaaaaagta 3000
 aaatgttctc tagaaataac actaaaggaa aagcatcagc aagaactcca atcttttaaa 3060
 attgagtatg aatgtaaact tgatgctcta gtaaaagaca gtgaagaaaa tgtaataaaa 3120
 atttttaaaat tgaaagaaaa tttagtatcc cttgaagagg ctttacaaaa taaagacaat 3180
 gaattcactt cgattaaaca tgaaaaggat gctattgtct gtgtgcagca agaaaaggat 3240

cagaagttgt tagagatgga aaagataatg catactcaac attgtgaaat taaagaactg 3300
 aagcagtcac gagagatggc attagaagac ctgaaaaagc tgcatgatga aaaaatcgag 3360
 tcattgagag ctgaatttca gtgcttagaa gaaaatcacc tgaaggaatt agaggacaca 3420
 ctgcacatca ggcacacaca ggagtttgag aaagttatga cagaccacaa tatgtctttg 3480
 gagaaattaa aaaaagaaaa tcagcaaaga attgaccaga tgctagaatc tcatgcctca 3540
 actattcagg aaaaagagca acagctgcag gagttgaaac tcaaagtttc tgacttgta 3600
 gacatgagat gtaagttaga ggttgaactt gcactaaagg aagcagaaac agatgagata 3660
 aagatcttgt tggaagagag cagaacacag cagaaggaaa tgctgaagtc tttacttgaa 3720
 caagagaccg aaaacttaag aacagaaata agtaaactaa accaaaaaat tcatgataat 3780
 aatgagagtt accaggtggg tttgtcagag ttaagagctt taatgacaat tgaaaaagat 3840
 cagtgcattt cagagttaat cagtagacat gaagaagaat ctaatatact taaggctgaa 3900
 ttagacaatg ttacatcttt gcatcgccaa gcatatgaaa tagaaaaaaa actgaaagaa 3960
 caaatagtgt aattgcagac tagattgaac tcagaattga gtgctcttga aaaacagaaa 4020
 gatgaaaaaa ttaccaaca agaagagaag tatgaagcac ttatccagaa cttgagaaa 4080
 gacaaggaga gactgggtcaa gaaccacgag caagacaaag aacacttaat tcaggagctt 4140
 aattttgaaa aaaacaaagc tgttcaaact gcactagatg aatttaagggt ggagagagaa 4200
 cttgttgaga aagagttatt agaaaaagtt aaacatcttg agaatcaaat agccaaaact 4260
 cctgcctttg agtcagccag agaagattct tcaagcttag ttgcggaact tcaagagaaa 4320
 cttcaagaag aaaaagctaa gtttctggaa caacttgaag aacaagagaa aagaaagaat 4380
 gaggaaatgc aaaatgtcag aacctctttg attgctgagc agcagaccaa ctttaacaca 4440
 gtcttaacaa gagagaaaat gaggaaagaa aacataataa atgatcttag tgataagcta 4500
 aaaagtacaa tgcagcagca agagcgggat aaagatttga tagagtcgct ctctgaggac 4560
 cgagctcggt tgcttgaaga gaagaagcag cttgaagagg aagtgaagta actccgcact 4620
 agcagttttc tttcctcagc acctgtggct gcagccccag agctctatgg tgcgtgtgca 4680
 cctgagctcc caggggagcc agagagatca gtcattggaga cggcagatga aggaagactg 4740
 gattccgcaa tggagacaag catgatgtct gtccaagaaa acatgttatt tgaagagaag 4800
 cagaggatca tgctcctaga acggacattg cagttgaaag aagaagaaaa caagcggtta 4860
 aatcaaagac tgatgtctca gagtttgtcc tcagtctctt caaggcattc tgaaaaata 4920
 gccattagag attttcaggt gggagatttg gttctcatca tcctagatga gcggcacgac 4980

aattatgtat tgtttactgt tagtcctact ttatatattc tgcactcaga gtctcttcct 5040
gccctggatc tcaaaccagg tgaggagct tcaggtgcat ctagaagacc ctgggtcctt 5100
gggaaagtaa tggaaaagga atactgtcaa gccaaaaagg cacaaaacag atttaaagtt 5160
ccittgggga caaagtttta cagagtgaag gctgtgtcat ggaataagaa agtatagcca 5220
cagaagaaat ctctacatct cataccattt ttgatttgc ctccagtgc gataaactac 5280
tctaaaaaca gctggccatt gttaggtttt tttttgtgt ttgtttgtt gttgttttt 5340
acaaaagtca acataacaat atacttcatt ggtggactgc acttacctt taagtggcta 5400
catcttagga acaataaatt tattaataat cttggctgaa tcaaatggt tttgtttgt 5460
ttccacccaa ataactagaa attcggacca aaatagatgt tttccaagg cagagcctgc 5520
actgtggctt gtgactagcc tcattagtgt cctgttaata aacattagct gaatagttac 5580
cagtgttgtt accagcattt gtcctctgt gaattcaaga gtcctgcac tctttaacat 5640
gttctttata aaatgtataa acccttccaa actattttaa gaggagtgtt attgcatgca 5700
gataatcata attttgagtt tgcctcagaa gactactaaa gcaaattgt tcatttttt 5760
ttaaaaaaat gccctttaat gtttcaaaaa aaaataacag tgtaattga ctgacttta 5820
gatcagccat aaataatgag cagtcttcaa aagcacttt cacacagatc atctgggctc 5880
cagggaggaa gagtctgtgc cactgatgtt ttcaagtga ggactcactc aaacctctca 5940
gcatcttagg actgtttcaa gtaatcatat tgatgaactc gtaattcatg gttgacctc 6000
agaagaagat attcattgta tattaacatt tagaggatc ttaaataaca aaagtctgta 6060
ttgtaaagga cctgtacaat ttaagacaa taaagaattg aaagtgtaaa tgtgtgtgcc 6120
ttttaaaggt tacattttaa atatattgcg tgatttctgg gaaaggtgaa aaaaatgttc 6180
tgtatcaaag agaaacctgt ttattaaaa atgttgttg taccctatgt aacagggtga 6240
agtgggtgtt tgtggaacag aacctgtga actcaagggt taaaagctgg cactgaacaa 6300
agatattgaa gtagctaggc tagttgattg gaaagagttt cttcagggtt gttgttagca 6360
gtaataaatg attcttttc agaaatattt aatttctcca taaaataag ttgatattt 6420
ttataaatat gtaatctaag agaatgaaaa tggaataaac atagtgtata gaatacctaa 6480
ttcaaaaaca tattaatgaa taaacgaaca aatgatta 6518

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-S1

<400> 5

gacgtaactg tatcagaggg

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-S2

<400> 6

tcagaggggtg aggtataagc

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-S3

<400> 7

atcatcatga agttatatgt atttctgg

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-ASP2

<400> 8

ttggccatta ctgaaactgc a

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-S4

<400> 9

tgtggaatct ttggtcagga

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-ASP1

<400> 10

taatccttgg atcaagcctg c

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer

sequence called CC1-S5

<400> 11

tgtaccactg ccaaacaaga a

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-S6

<400> 12

cttcggaagt tcagccattc

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-S6R

<400> 13

tccatccttg gtgaagaagc

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-S7

<400> 14

tcccatcca aacatagaac a

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-S8

<400> 15

aaggaagacc ttgcccatt t

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-S9

<400> 16

gaactgaagc agtcacgaga aa

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-S10

<400> 17

ttgtcagaca cgagatgcaa

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-S11

<400> 18

aaattatcag gtgggcttag ca

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-S

<400> 19

ccaggagcaa gacagagaac

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-AS

<400> 20

cgagctcgat cttcagaaag

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-AS5

<400> 21

tgcttgcttc cattgctgaa

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-AS4

<400> 22

ccaaatctcc cacctgaaaa

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called HCC22INTS

<400> 23

ctagacgaac gccatgacaa

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called HCC22INTAS

<400> 24

tggttgaca gtattctttt tcc

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-AS2

<400> 25

tgagcactgc aggacaaatc a

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called CC1-AS1

<400> 26

tgatgaatga gcactgcagg a

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called RB1CC-RS1

<400> 27

cctccctgcc tcctagagtt

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called RB1CC-R4

<400> 28

tagtcctcgg cagcggttac

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called RB1CC-R3

<400> 29

aaactcagaa aaccggcaac

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called RB1CC-R2

<400> 30

tgccacagtt tgcactgtaa g

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called RB1CC-R1

<400> 31

tttccaatgc aagctgtgtc

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called RB1CC-RS2

<400> 32

gagtgaagc cgtatcatgg a

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called RB1CC-RS3

<400> 33

aatgcggacc aaactacttc a

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called RB1CC-RS4

<400> 34

tcagttggatt ggtcatctgg

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called RB1CC-RS5

<400> 35

tgattgctgg gaagtgtgaa

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called RB1CC-RS6

<400> 36

gagaattgtt tgaggtttgt tgc

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called RB1CG-R5

<400> 37

ttgctcaatg gcaacttctc

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK3-1-S

<400> 38

gggtgaggta taagctcaca gaa

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK3-2-S

<400> 39

tcttatgtga tcgtccacct g

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer

sequence called MMK3-2-AS

<400> 40

caaaggattc cctttttgat ttt

<210> 41

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK6-2-S

<400> 41

gctaatacaga agagagctga aaactt

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK1-1-S

<400> 42

gatggtgatac tgcccttttt

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK1-2-S

<400> 43

taagcatgcc attcaaagca

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK15-1-S

<400> 44

tttctttata caggaagtc ttt

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK15-2-AS.

<400> 45

ttttcagaat gccttgaaga t

<210> 46

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK31-2-S

<400> 46

aggataccat catcctagac gaa

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK31-2-AS

<400> 47

cttaccaccc tcacctggtt

<210> 48

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK40-S

<400> 48

ttttgtattt taagtttagg aactgc

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK38-S

<400> 49

ataggataca aatccaattt ttc

<210> 50

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK31-S

<400> 50

aaaatatagg atacaaatcc aatgaca

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK36-S

<400> 51

aaaggatgca tctgtattac ctga

<210> 52

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MMK340-S1

<400> 52

gccaacctgg aggactgtt

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-S1

<400> 53

ggttctctga gtttcaccag taa

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-S2

<400> 54

atcaacactg gagggtagagg

<210> 55

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called EcoCC1S3

<400> 55

atcatcatga agttatatgt gtttctgg

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-S7

<400> 56

gatgcctgca gttttccaca

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-S8

<400> 57

acgtggcaaa gaacttaggg

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-AS4

<400> 58

gcttcttctt gctggacagt

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-S11

<400> 59

ccttggacca gatgattgct

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-S9

<400> 60

gggtcccctt actttgtgac t

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-AS8

<400> 61

catccaaact ttgtgctgct

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-S12

<400> 62

tgctgcacaa gactctcaca

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-AS6

<400> 63

ggcacagatc gtccttgatg g

<210> 64

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-S13

<400> 64

tgaacttgca ctaaaggaag ca

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-AS7

<400> 65

cagcatttcc ttctgctgtg

<210> 66

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-S14

<400> 66

tgagtgtctt tgaaaaacag aaag

<210> 67

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-S15

<400> 67

ttgcggaact tcaagagaaa c

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MIRB1CC-5

<400> 68

ctggaacaac ttgaagaaca agag

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer

sequence called MIRB1CC-3

<400> 69

acgagctcgg tcctcagaga

<210> 70

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-S3

<400> 70

tcaggtggga gatttggttc

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-AS3

<400> 71

tgccgctcat ctaggatgat

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-AS2

<400> 72

cagcactgga ggacaaatca

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-AS1

<400> 73

agtcacaagc cacagtgcag

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-ASR1

<400> 74

tgctttgaat ggcattgctta

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-ASR2

<400> 75

cctcaccctc cagtgttgat

<210> 76

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-ASR3

<400> 76

cctccgcacc atcttctg

<210> 77

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called INTRON1ASR

<400> 77

cagggtcccc gtaggact

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-SR1

<400> 78

tcagggtggga gatttggttc

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-SR2

<400> 79

ccagcatttg tcctcttggtg

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC3-S3

<400> 80

ttttgagttt gcctcagaag a

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC3-S4

<400> 81

tcggaattca tggttgacct

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC3-AS2

<400> 82

tttcccagaa atcacgcaat

<210> 83

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC3-AS13

<400> 83

tcctttgttca gtgccagctt t

<210> 84

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC15S

<400> 84

accaggtggg tttgtcagag

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC15AS

<400> 85

cttggcgatg caaagatgta

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-3S

<400> 86

acactggagg gtgaggtgtc

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MCC-3AS

<400> 87

gtgtcaaagt tcagcgtggt

<210> 88

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT1-S

<400> 88

gacggttggt tcggttgg

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT1-AS

<400> 89

ttggcaactg agtggcatta

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT2-S0

<400> 90

tgccactcag ttgccaagta

<210> 91

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT2-S

<400> 91

cacagtatct ggcggtaagt ca

<210> 92

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT3-AS

<400> 92

cccagcgctg taagtacaca

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT4-S

<400> 93

taagcatgcc attcaaagca

<210> 94

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT4-AS

<400> 94

caggtgcacg gtcacataag

<210> 95

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT5-S

<400> 95

gcagttttcc acactgttgc

<210> 96

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT5-AS

<400> 96

ctccagattg gccatgattg

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT6-S

<400> 97

gccaatctgg aggactgttc

<210> 98

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer

sequence called MINT6-AS

<400> 98

agaatccggt cttcccaaac

<210> 99

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT7-S

<400> 99

cccaatgatg tggaatctct g

<210> 100

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT7-AS

<400> 100

agcaatcatc tggccaagg

<210> 101

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT8-S

<400> 101

aagatcggct gtatgcctt

<210> 102

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT8-AS

<400> 102

caacagtttt ctgtggttt gc

<210> 103

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT9-S

<400> 103

ggatgcatct gtgttacctg a

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT9-AS

<400> 104

gcctgcagtt tttctccatc

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT10-S

<400> 105

gctccgcctt gtaatagagc

<210> 106

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT10-AS

<400> 106

ccaaaggatt ccctttttga

<210> 107

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT11-S

<400> 107

gggctggtgc ttagtcaaa

<210> 108

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT11-AS

<400> 108

aaaatgagga aggccaggag

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT12-S

<400> 109

actcctggcc ttcctcattt

<210> 110

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT12-AS

<400> 110

tgaggaatgg ctgcacttct

<210> 111

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT13-S

<400> 111

gcctcgaaaa ttgactgtg a

<210> 112

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT13-AS

<400> 112

tccaaacttt gtgctgttt t

<210> 113

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT14-S

<400> 113

aaaagcagca caaagtttgg a

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT14-AS

<400> 114

tggaggagga gtttttggtg

<210> 115

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT15-S

<400> 115

ccacgagcaa gacaaagaac

<210> 116

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT15-AS

<400> 116

tccgcaacta agcttgaaga a

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT16-S

<400> 117

tgaggaaatg caaaatgtca

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT16-AS

<400> 118

gctcttgctg ctgcattgta

<210> 119

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT17-S

<400> 119

aaagtacaat gcagcagcaa ga

<210> 120

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT17-AS

<400> 120

tgctgaggaa agaaaactgc t

<210> 121

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT18-S

<400> 121

agctctatgg tgcgtgtgc

<210> 122

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT18-AS

<400> 122

gagcatgatc ctctgcttct c

<210> 123

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT19-S

<400> 123

tctgaagaga agcagaggat ca

<210> 124

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT19-AS

<400> 124

cagtctttga tttaaccgct tg

<210> 125

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT20-S

<400> 125

cattgcagtt gaaagaagaa gaaa

<210> 126

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT20-AS

<400> 126

tgcccttgaag agactgagga c

<210> 127

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer

sequence called MINT21-S

<400> 127

tctcttcaag gcattctgaa aa

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT21-AS

<400> 128

atccagggca ggaagagact

<210> 129

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT22-S

<400> 129

agcggcacga caattatgta

<210> 130

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT22-AS

<400> 130

ttttccatta ctttccaag ga

<210> 131

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT23-S

<400> 131

ctgggtcctt gggaaagtaa

<210> 132

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

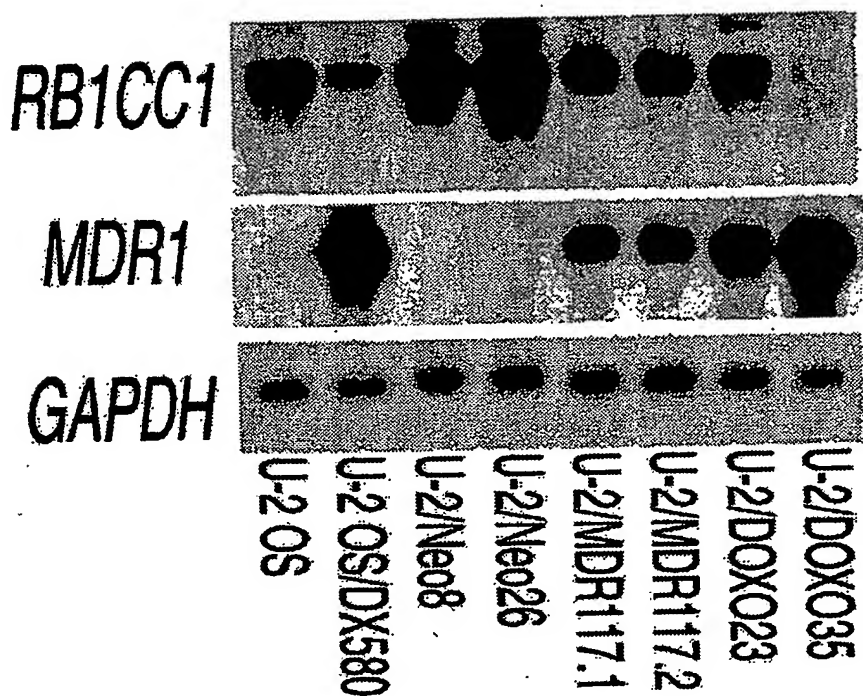
<223> Description of Artificial Sequence:artificially synthesized primer
sequence called MINT23-AS

<400> 132

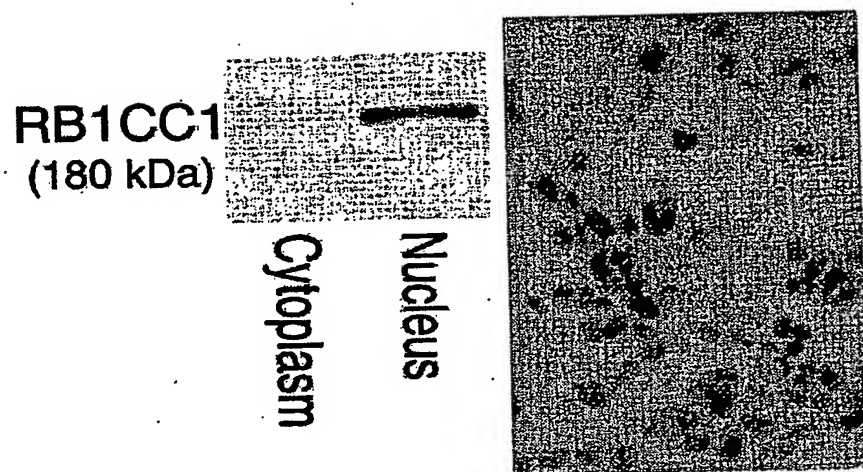
cagcactgga ggacaaatca

【書類名】 図面

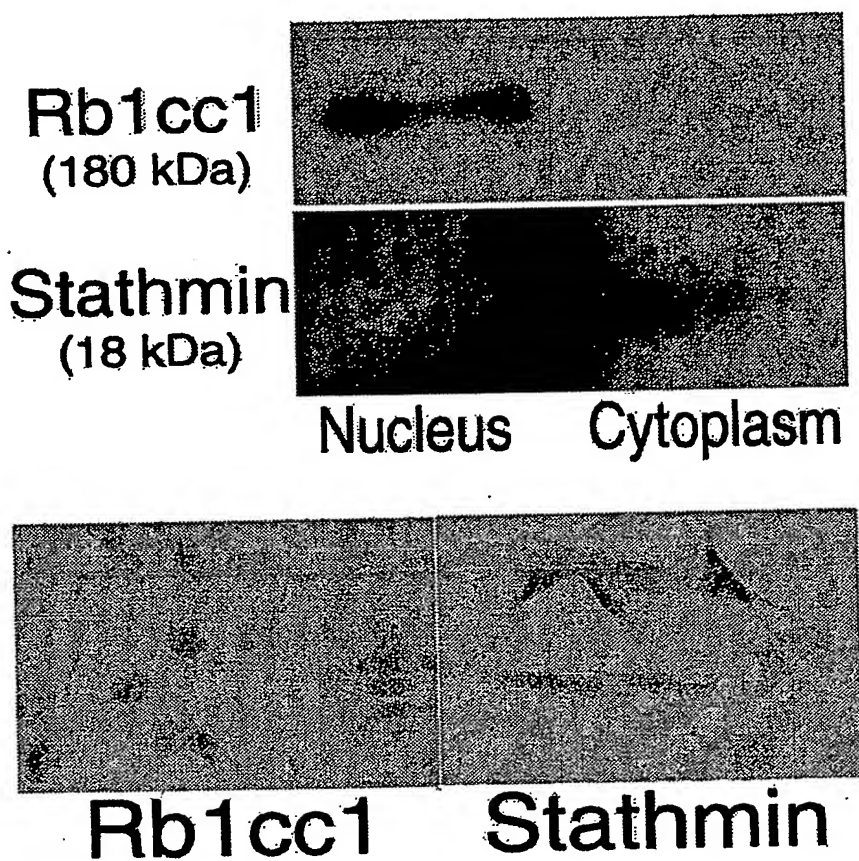
【図 1】



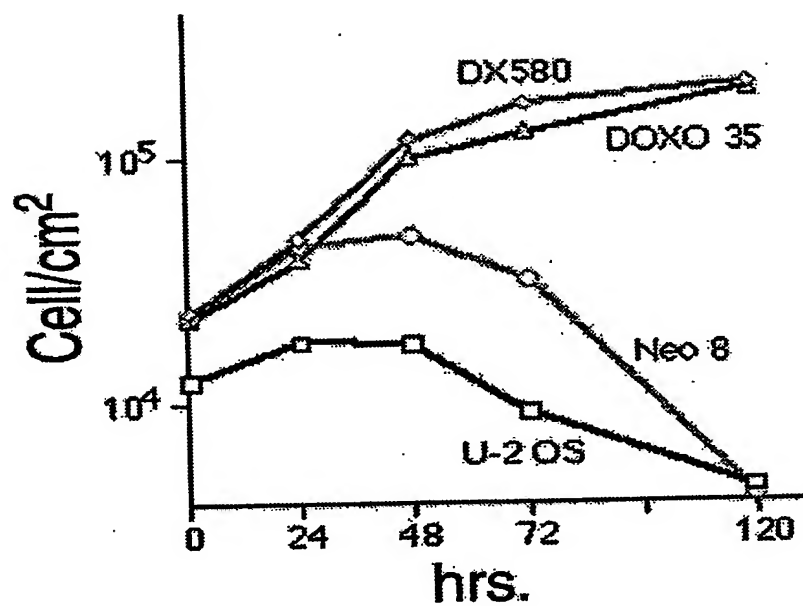
【図 2】



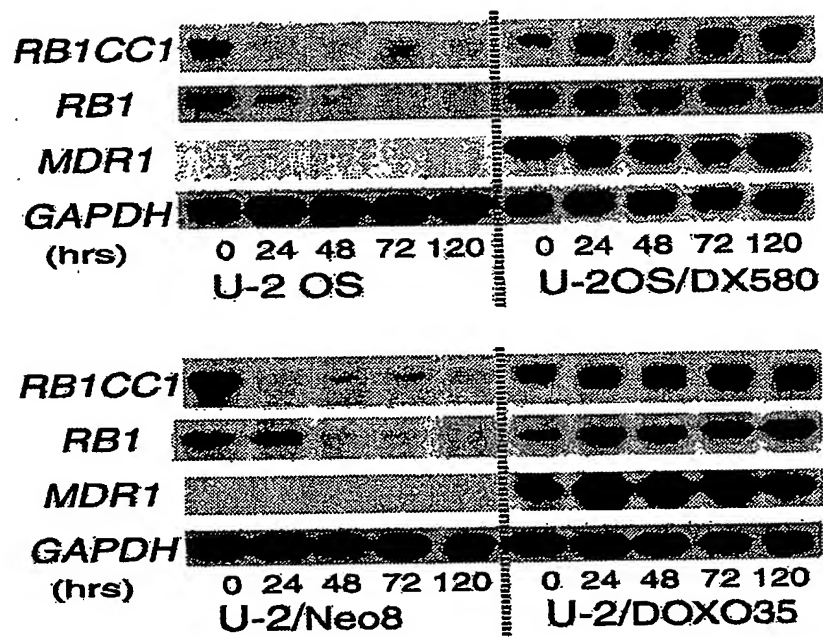
【図3】



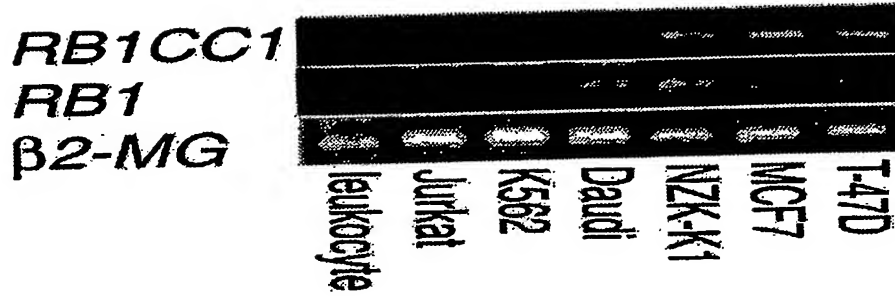
【図4】



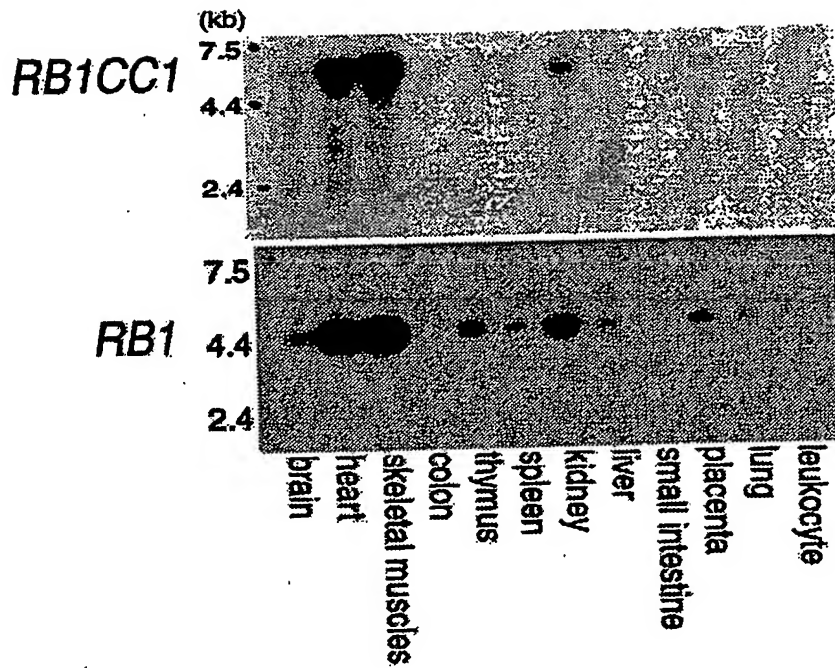
【図5】



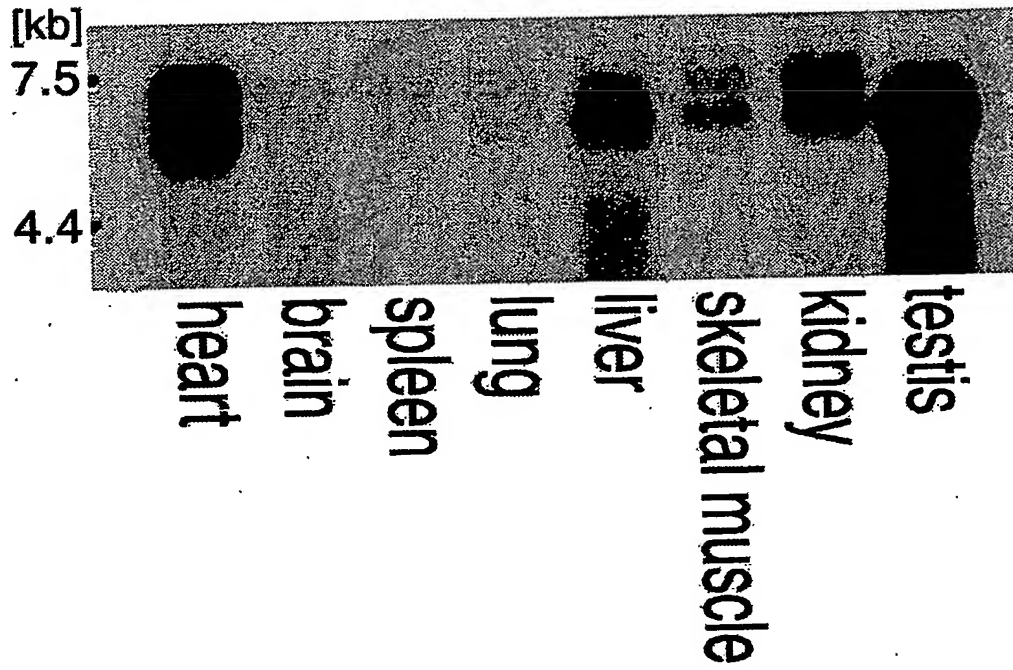
【図 6】



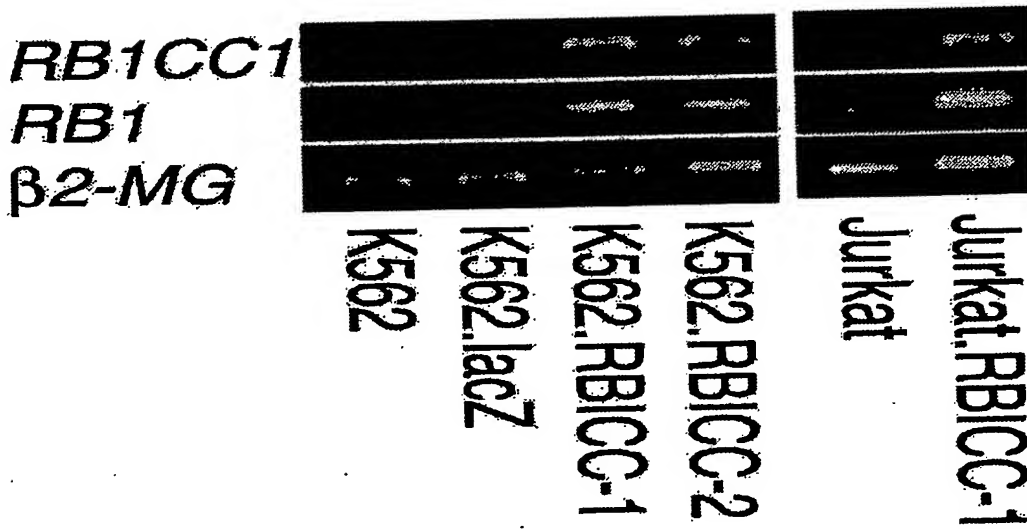
【図 7】



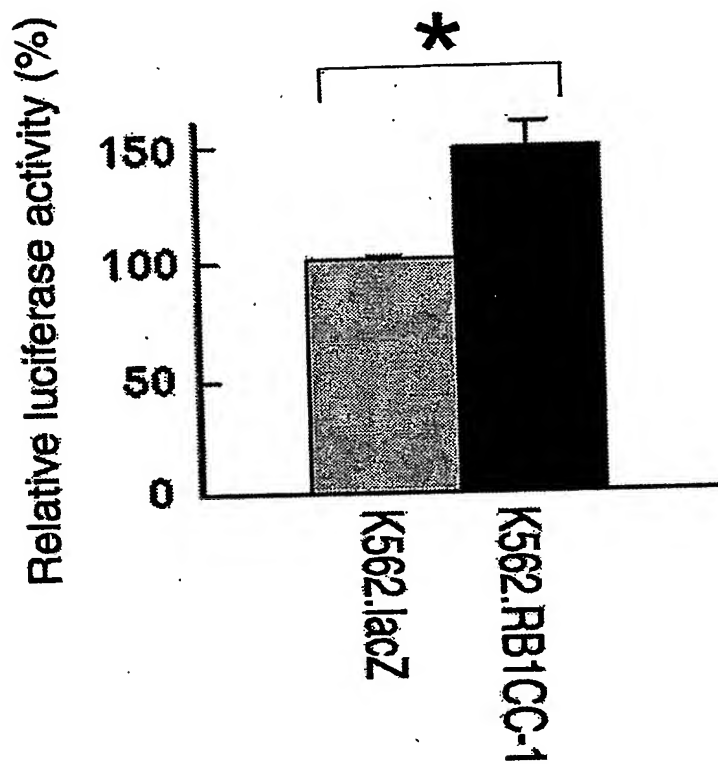
【図 8】



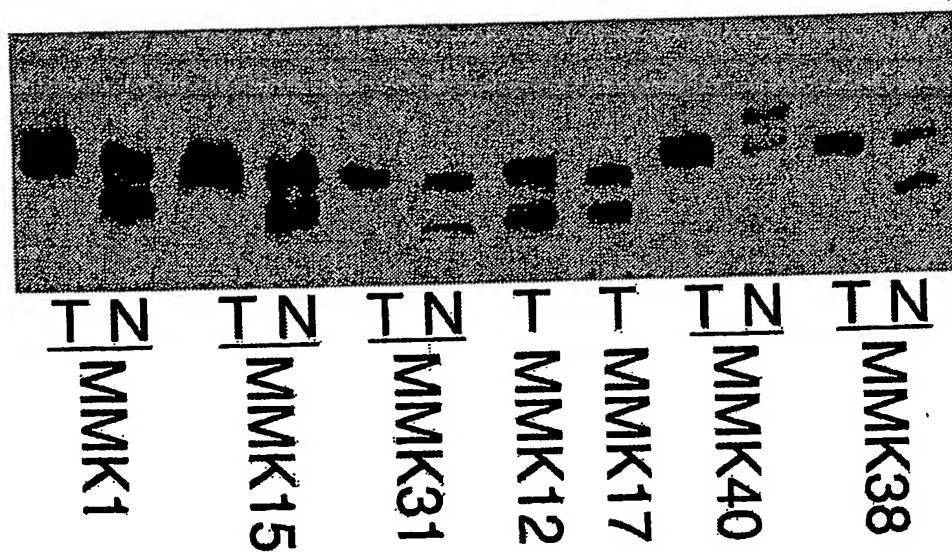
【図 9】



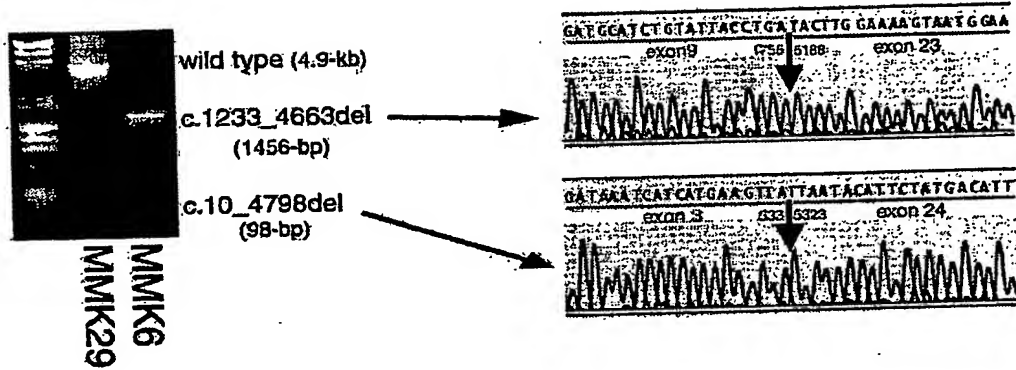
【図10】



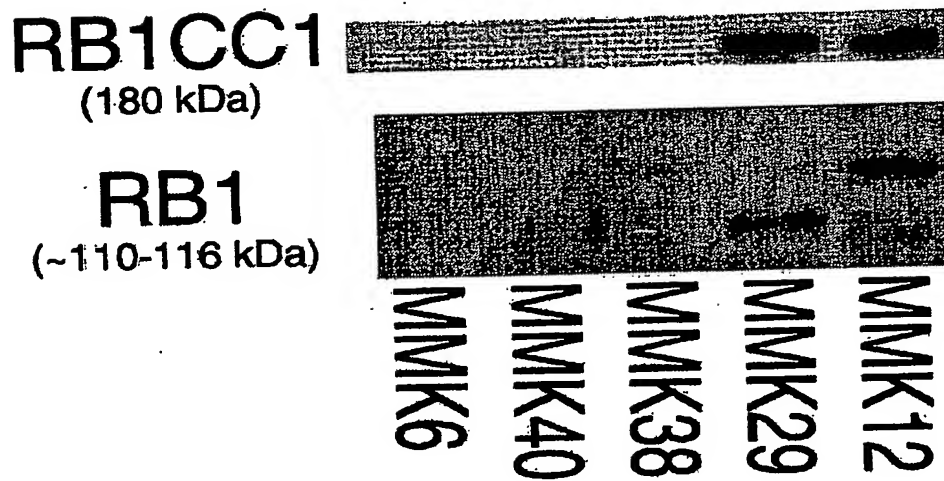
【図11】



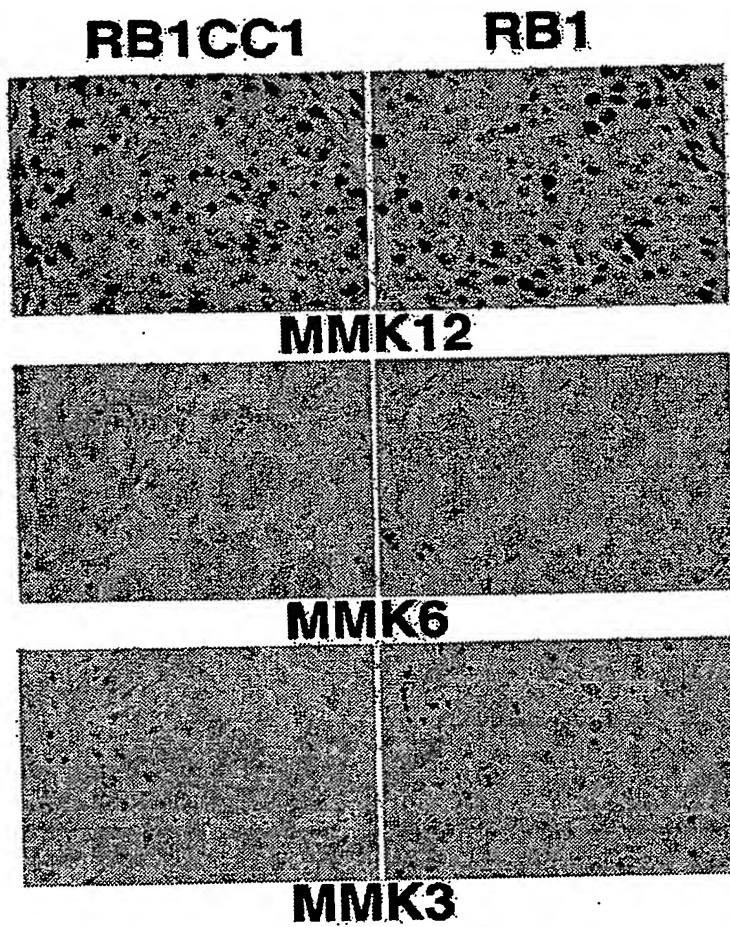
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 14】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

癌における多剤耐性に関与している新規遺伝子及びその蛋白質の検索・提供し、それら遺伝子及びその蛋白質の機能の解明し、該遺伝子の検査方法及び該蛋白質に対する抗体を提供し、上記の遺伝子及び抗体を用いて、癌の検査診断方法を提供する。

【解決手段】

ヒト又は動物の細胞の核に存在し、転写因子機能及び／又はレチノブラストーマ-1 遺伝子 (RB1 遺伝子) 或いはその遺伝子産物の発現を誘導しうる機能を有する新規蛋白質 (RB1CC1) 又はポリペプチド、及びその遺伝子を見出した。そのアミノ酸配列及び cDNA 配列を決定し、新規遺伝子とハイブリダイズするプライマーにより、遺伝子の増幅、検出を行い、新規遺伝子の発現、変異等を検査し、癌細胞の増殖との関連を見出し癌の検査を行ない、新規蛋白質に対する抗体を調製し、抗体による新規蛋白質の検出により、新規蛋白質と癌細胞の増殖との関連を見出し癌の検査を行なった。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-161400
受付番号	50200799484
書類名	特許願
担当官	長谷川 実 1921
作成日	平成14年 8月 2日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 6月 3日
【特許出願人】	
【識別番号】	502198836
【住所又は居所】	〒525-0027 草津市野村5丁目9-34 -809
【氏名又は名称】	茶野 徳宏
【特許出願人】	
【識別番号】	502198847
【住所又は居所】	〒612-8017 京都市伏見区桃山南大島町 101-5
【氏名又は名称】	岡部 英俊
【特許出願人】	
【識別番号】	502136377
【住所又は居所】	東京都品川区上大崎1-12-22-201
【氏名又は名称】	池川 志郎
【代理人】	申請人
【識別番号】	100088904
【住所又は居所】	東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩 本町ビル6F
【氏名又は名称】	庄司 隆

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [502198836]

1. 変更年月日 2002年 6月 3日

[変更理由] 新規登録

住 所 〒525-0027 草津市野村5丁目9-34-809

氏 名 茶野 徳宏

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502198847]

1. 変更年月日

2002年 6月 3日

[変更理由]

新規登録

住 所

〒612-8017 京都市伏見区桃山南大島町101-5

氏 名

岡部 英俊

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502136377]

1. 変更年月日	2002年 4月16日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都品川区上大崎1-12-22-201
氏 名	池川 志郎

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.